

RESISTANCE EXTRACHROMOSOMIQUE A LA
CARBENICILLINE CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA.
ESSAI D'ISOLEMENT DU PLASMIDE 56 Be

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

le 26 octobre 1977

PAR

SAGE Patrice

né le 24 juin 1950 à Dijon

MM.	L. ODDOUX	Professeur
	Y. MICHEL-BRIAND	Professeur
	M. CARRAZ	Professeur
	M. GORUNOVIC	Professeur
	J. REYNAUD	Professeur Agrégé

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année 1977 - N°

RESISTANCE EXTRACHROMOSOMIQUE A LA
CARBENICILLINE CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA.
ESSAI D'ISOLEMENT DU PLASMIDE 56 Be

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

le 26 octobre 1977

PAR

SAGE Patrice

né le 24 juin 1950 à Dijon

MM.	L. ODDOUX	Professeur
	Y. MICHEL-BRIAND	Professeur
	M. CARRAZ	Professeur
	M. GORUNOVIC	Professeur
	J. REYNAUD	Professeur Agrégé



1964

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

Premier Vice-Président : M. le Professeur ELBAZ

Deuxième Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant

Troisième Vice-Président : M. C. BADOR, Etudiant

Secrétaire Général de l'Université : M. J. RAMBAUD, Administrateur civil

Directeurs des Unités d'Enseignement et de Recherche :

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de Médecine ALEXIS-GARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de Médecine LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de Médecine SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : Monsieur le Pr C.A. BIZOLLON

U.E.R. de Techniques de Réadaptation : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de Biologie Humaine : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de Sciences Odontologiques : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de Physique : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de Chimie-Biochimie : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de Sciences de la Nature : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de Sciences Physiologiques : Mademoiselle le Pr J-F. WORBE

U.E.R. de Physique Nucléaire : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de Lyon : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de Mécanique : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT.

A ma femme, qui m'a beaucoup aidé, et à ma fille

*A mon père, qui est à l'origine de ce travail, et à ma mère
en témoignage de ma reconnaissance et de mon affection*

A ma belle-mère

A mon frère, à ma soeur et à mon beau-frère

A mes grands-parents

Et à tous les miens.

A notre Président de Thèse

Monsieur le Doyen L. ODDOUX

*Professeur de Cryptogamie et de Phytopharmacie
à la Faculté de Pharmacie de Lyon*

*Il nous fait le grand honneur de présider
notre jury de thèse.*

*Il nous a accueilli dans son Laboratoire
pendant plusieurs années et nous connaissons
ses grandes qualités de Maître.*

*Qu'il trouve dans ce travail l'expression
de notre admiration et de notre attachement.*

A Monsieur le Professeur Y. MICHEL-BRIAND

Professeur de Bactériologie et de Virologie à la

Faculté de Médecine de Besançon

Chef de Service au Centre Hospitalier et Universitaire de Besançon

*Il nous a suggéré ce travail qu'il a suivi
pas à pas et inspiré à chaque instant.*

*Pendant deux ans, nous avons découvert
avec lui le domaine de la Recherche Fondamen-
tale et nous avons pu apprécier ses qualités
de Maître.*

*Il nous a permis en outre de faire une
expérience de Biologie Hospitalière dont nous
avons beaucoup appris.*

*Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude
et de notre grande reconnaissance.*

A notre Juge

Monsieur le Doyen M. CARRAZ

Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

*Professeur de Bactériologie et d'Immunologie de la Faculté
de Pharmacie de Lyon*

*Nous nous rappelons ses cours dispensés
avec brio et nous avons apprécié l'étendue
de ses connaissances.*

*Il a accepté d'être aujourd'hui notre Juge
Qu'il en soit remercié.*

A notre Juge

Monsieur le Professeur M. GORUNOVIC

*Professeur de Matière Médicale et de Physiologie végétale
à la Faculté de Pharmacie de Belgrade*

*Il a accepté un très long déplacement
pour nous juger aujourd'hui.*

*Nous avons appris à connaître la valeur de
son Exemple et ses grandes qualités
scientifiques.*

*Que ce travail soit l'expression de notre
gratitude et de notre très respectueuse
affection.*

A notre Juge

Monsieur Jean REYNAUD

*Maître de Conférence Agrégé au Laboratoire de Botanique
et de Physiologie végétale de la Faculté de Pharmacie de Lyon*

*Il siège aujourd'hui dans notre Jury.
Nous n'oublions pas la valeur de son
Enseignement et ses qualités de Pédagogue.
Qu'il trouve dans ce travail, l'expression
de notre très grande reconnaissance.*

A Monsieur le Recteur Pierre MAGNIN

Professeur à la Faculté de Médecine de Besançon

*Qu'il trouve ici l'expression de
nos remerciements et de notre fidélité.*

A Madame le Docteur DURON

Pharmacien-chef de l'Hôpital de Besançon

*Elle nous a toujours accueilli dans son
service et nous avons pu apprécier sa grande
compétence et sa disponibilité.
Que ce travail soit le gage de notre
respectueuse confraternité.*

A Monsieur D. TALON

Pharmacien - Assistant des Hôpitaux

*Qu'il trouve ici l'expression de mon
amitié et de mes remerciements pour
ses conseils et son aide toujours efficace.*

A Mademoiselle M. JOUVENOT

Docteur ès Sciences - Attachée de Recherche I.N.S.E.R.M.

*Elle m'a précédé dans ce travail et a
toujours su me faire profiter de son
expérience acquise.
Qu'elle en soit remerciée.*

A Mesdames BARALE, BRUAND, DUPONT et LEPRAT

Assistantes des Hôpitaux

A Mesdames PONCET et CHARDON

Pharmaciens

A Monsieur J.M. LAPORTE

Et à tout le Personnel du Laboratoire.

A Messieurs GIRY, LEPORT et MOREAU

Pharmaciens

*Ils ont été mes Maîtres de Stage
tant à l'officine que dans l'Industrie
Pharmaceutique.*

*Que ce travail soit l'expression de
ma reconnaissance.*

A Mademoiselle M.L. ETIENNE

*Elle a réalisé le travail dactylographique
de cette thèse avec patience, précision
et compétence.*

*Qu'elle trouve ici l'expression de mes
très sincères remerciements.*

Le but de notre travail est d'essayer d'isoler un plasmide (R 56 Be) hôte d'une souche sauvage de Pseudomonas aeruginosa isolée au C.H.U. de Besançon. Les premiers essais avaient révélé les difficultés d'isolement d'un tel plasmide. Ces difficultés sont certes réelles, car ce plasmide apparaît très semblable au plasmide RP_{1-1} (48), facteur extrachromosomique non encore isolé jusqu'à présent, à notre connaissance.

Il nous a paru souhaitable, à propos des essais d'individualisation de ce plasmide, de redéfinir ces éléments extrachromosomiques et de rappeler leurs propriétés qui permettent d'expliquer les difficultés d'isolement. Nous reviendrons en outre sur le rôle du plasmide R dans la résistance aux antibiotiques.

S O M M A I R E

LIVRE I

Rappels bibliographiques sur les plasmides

LIVRE II

Plasmides de Pseudomonas

LIVRE III

Matériel et Méthodes

LIVRE IV

Résultats

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

L I V R E I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Dès l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique courante, on observa en 1940 que les souches bactériennes pouvaient acquérir une remarquable aptitude à la résistance à ces agents antimicrobiens. (111) (112).

Des généticiens comme LURIA et LEDERBERG (65) démontrèrent alors qu'un phénomène de mutation-sélection était responsable de cette évolution vers la résistance. Mais un autre mécanisme fut découvert au cours des années 1955-1960 par des bactériologistes japonais (90) ; certaines bactéries résistantes peuvent posséder en plus de leur chromosome d'autres structures composées d'ADN : les plasmides de résistance. On appelle facteurs de résistance ou facteur R les plasmides conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez de nombreuses espèces de bactéries, (Escherichia coli, bacilles typhiques, vibrions cholériques...) (6).

Actuellement, 60 à 70 pour cent (9) des échecs thérapeutiques sont dus à des bactéries hébergeant des plasmides de résistance, plus ou moins redoutables selon le nombre d'antibiotiques contre lesquels ils protègent la bactérie qui les héberge. (75).

On note actuellement que chez des individus sains ou malades, chez les animaux, les bactéries porteuses de facteurs R sont de plus en plus nombreuses (15). L'hypothèse la plus simple est que ces bactéries ont été sélectionnées par les quantités d'antibiotiques importantes utilisées aussi bien en thérapeutique qu'à d'autres fins ; en particulier, l'antibio-supplémentation de l'alimentation du bétail a été mise en cause.

Ainsi, 100 pour cent des porcs ou des veaux recevant des antibiotiques ont dans le tube digestif des entérobactéries porteuses de facteurs R, (15). Un autre exemple (13) montre que 38 pour cent des membres d'une communauté urbaine (jeunes recrues de l'armée néerlandaise) sont porteurs d'Escherichia coli multirésistants et capables de transférer leur résistance à des germes sensibles dont certains peuvent être hautement pathogènes.

En revanche, la situation est très différente dans les pays où il n'existe ni contacts avec des sujets ayant reçu une thérapeutique, ni antibiotiques. Ainsi, une étude effectuée sur une population primitive de l'île de Bornéo a révélé moins de un pour cent de coliformes isolés des selles capables de transférer leur résistance (15). Cette situation devait être générale avant l'apparition des antibiotiques. Il convient néanmoins de préciser que les plasmides devaient exister avant l'ère des antibiotiques ; ainsi EVANS a identifié un plasmide codant une

résistance à l'Ampicilline dans un Escherichia coli isolé bien avant l'utilisation des antibiotiques. Cette situation peut s'expliquer par le fait que les microorganismes ont pu être en contact avec des antibiotiques synthétisés par les streptomycètes du sol.

En trente ans, le pourcentage de sujets porteurs d'Escherichia coli contenant des facteurs R est passé de 0,5 à 1 pour cent jusqu'à 50 à 100 pour cent (15).

Un tel changement écologique est probablement le phénomène le plus brutal qui se soit produit dans l'histoire du monde bactérien (32). Pourtant un certain nombre d'éléments vient heureusement limiter les effets néfastes dus à cette situation. D'abord de nombreux facteurs R n'occasionnent pas la résistance à tous les antibiotiques ; ensuite le transfert d'une souche à l'autre, aisé in vitro, est peut être moins facile dans certaines localisations infectieuses (mises à part les infections cutanées et urinaires) ; de plus, les espèces pathogènes sont statistiquement moins "infectées" par les facteurs R que les coliformes et enfin la diminution de la pression de sélection antibiotique peut amener une perte spontanée des facteurs.

Cependant, pour la première fois, des bacilles typhiques porteurs de facteurs R ont causé en 1973 des épidémies meurtrières (15) en Amérique Latine et dans le Sud-Est asiatique. Ces souches commencent à être isolées en Europe depuis un ou deux ans. La situation est très préoccupante dans

les milieux hautement contaminés et où les antibiotiques doivent être utilisés à grande échelle. Ce qui est le cas de certains services hospitaliers recevant des malades polyinfectés.

Il est donc nécessaire d'apprécier les résistances constantes de nature transférable et de prévoir dans une certaine mesure le devenir de ces résistances. Mais qu'est-ce qu'une résistance transférable et son support génétique, le plasmide ?

CHAPITRE II

DEFINITIONS

A - PLASMIDES et EPISOMES

En 1952, LEDERBERG (65) proposait d'appeler "plasmides" toutes les structures génétiques capables d'auto reproduction (65). Dix ans plus tard, JACOB et WOLMANN (51) proposèrent de nommer "épisomes" des structures génétiques ajoutées au génome d'une cellule et qui, dans cette cellule, peuvent exister sous deux états distincts et d'ailleurs mutuellement exclusifs : l'état autonome et l'état intégré.

Actuellement, l'opposition entre ces deux catégories d'éléments perd quelque peu de sa valeur, car la distinction entre ces différentes situations génétiques se fait non plus sur la base de l'insertion ou de la non insertion dans le chromosome bactérien, mais plutôt selon la fréquence et les conditions de cette insertion (50).

En 1976, NOVICK et un groupe de plasmidologues (89) définissent le plasmide comme un élément génétique extra-chromosomique, comme un réplicon hérité de manière stable et maintenu aisément sans sélection spécifique dans un état extra-chromosomique. Le plasmide est donc une molécule d'ADN représentant 0,5 à 3 % du chromosome et dont les fonctions, bien que non vitales pour la bactérie, peuvent être avantageuses dans certaines conditions. Un plasmide capable de se conjuguer est un plasmide qui peut déterminer son propre transfert par conjugaison.

NOVICK définit l'épisome "comme un élément génétique qui peut se répliquer alternativement sous deux états : soit à l'état intégré, soit indépendamment du chromosome de l'hôte".

Le plasmide R ou de résistance est un plasmide qui porte une information génétique codant pour la résistance aux antibiotiques ou à d'autres produits antibactériens.

B - REPLICON

Revenons quelque peu sur ce système, car il permet de mieux comprendre l'unicité de fonctions de tous les ADN et les rapports plasmide-chromosome. JACOB, BRENNER et CUZIN (52) (53) désignent sous le nom de réplicon l'unité intégrale de répllication. Cette hypothèse suggère que le système de contrôle de la répllication du chromosome soit situé dans la membrane de la bactérie. Les éléments génétiques, physiquement distincts du chromosome peuvent être également des réplicons. Les plasmides sont des réplicons et les études biochimiques et génétiques ont confirmé dans une certaine mesure l'existence d'une liaison entre ADN et membrane. Cette liaison et sa nature seront étudiées plus loin.

Chaque réplicon contient deux types de structures :

a) deux déterminants génétiques qui intéressent spécifiquement la réplication et qui permettent à l'ADN de se répliquer selon un réplicon donné

- . le premier déterminant est un gène de structure contrôlant une protéine dite "initiateur"
- . le second déterminant est le "réplicateur" qui est reconnu par "l'initiateur"

Ces deux déterminants sont bien entendu spécifiques et sont les deux seuls éléments spécifiques du réplicon. Voir la structure génétique des plasmides, figure II, page 10.

b) des déterminants codant pour des fonctions qui caractérisent le plasmide étudié

Par exemple, le facteur F porte des gènes permettant le transfert du matériel génétique, et les facteurs R codent pour des enzymes modifiant les antibiotiques.

Le plasmide et le chromosome sont deux réplicons qui peuvent être dans la même bactérie et leurs relations sont diverses.

Par exemple, le facteur F se multiplie indépendamment du chromosome, mais en accord avec lui de façon à conserver le rapport d'un épisome par chromosome. Mais cet équilibre peut être rompu ; en effet, si des bactéries F^+ sont mises en

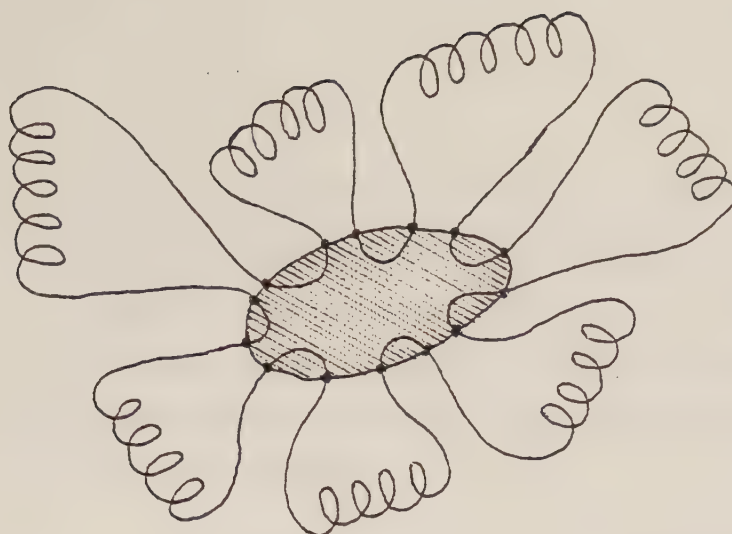


Fig. I Schéma du chromosome bactérien selon WORCEL (50).

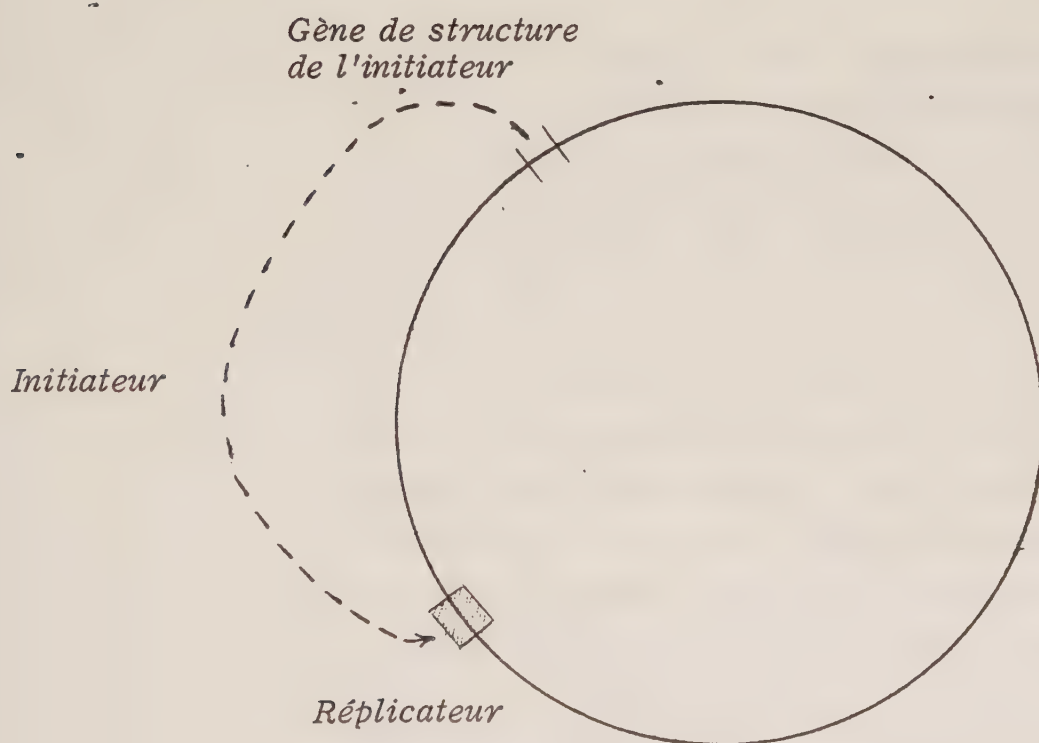


Fig. II Schéma de la structure d'un réplicon selon THEZE (50).

contact avec des bactéries F^- , le facteur F se répandra dans toutes les bactéries par transfert. Par contre, certaines bactéries peuvent perdre le facteur F et devenir F^- (la fréquence de perte est de 10^{-2} à 10^{-4} selon les souches et elle est augmentée par traitement avec différents produits comme l'acridine orange).

L'étude des mutants thermosensibles (25) a permis de préciser le mécanisme de répllication du facteur F . Dans ces expériences sont employés des facteurs F qui portent des marqueurs génétiques faciles à repérer comme le caractère lac^+ (utilisation du lactose) (26).

Si le facteur $F^- lac^+$ est présent dans une bactérie lac^- , le caractère lac^+ sera le témoin de la présence du facteur F . Des mutants thermosensibles $F lac^+$ ont été obtenus et dans ces bactéries, le facteur $F lac^+$ se réplique à $25^\circ C$, tandis qu'à $42^\circ C$ les bactéries deviennent lac^- , car le facteur ne se réplique plus. Cependant, quelques clones lac^+ subsistent à $42^\circ C$, ce qui indique que le facteur $F lac$ a pu persister. Celui-ci s'est en effet intégré au chromosome et s'est donc répliqué avec l'autre réplicon, c'est-à-dire le chromosome. Le chromosome a préservé l'élément génétique extrachromosomique. De manière réciproque, des mutants de chromosomes bactériens thermosensibles pour la répllication ont pu être "sauvés" par l'intégration d'un facteur F normal : ce facteur a pris la répllication du chromosome sous son contrôle (40).

L'ensemble de ces expériences illustrent les prévisions que l'on pouvait faire à partir de l'hypothèse du réplicon.

CHAPITRE III

CLASSIFICATION des PLASMIDES

Devant le grand nombre de plasmides découverts et étudiés, il s'est révélé nécessaire de procéder à leur classement. Plusieurs méthodes sont possibles.

A - Par incompatibilité

L'attachement des éléments plasmidiques à des sites cellulaires spécifiques peut être avancé comme une des explications de l'incompatibilité plasmidique.

Ce phénomène observé se manifeste par l'incapacité de deux éléments plasmidiques, capables d'être distingués, de cohabiter de manière stable dans une bactérie (9).

Les facteurs R peuvent être classés en deux groupes appelés R_{fi}^{+} et R_{fi}^{-} en fonction de leur parenté avec le facteur sexuel F (13).

a) Les facteurs R_{fi}^{+}

Ils sont capables d'inhiber le transfert de F quand ces deux éléments sont présents dans une même bactérie. Les facteurs de ce type gouvernent la synthèse de R pili pratiquement identiques aux F pili des souches F^{+} . Vraisemblablement, les facteurs R_{fi}^{+} synthétisent un "répresseur" (14) qui inhibe les propriétés du facteur F, d'où le nom de R_{fi}^{+} , abréviation de

'fertility inhibition positive'

b) Les facteurs $R\ f_i^-$

Ils synthétisent des pili différents des F pili. Ils ne répriment pas la fertilité due à F , d'où le nom de $R\ f_i^-$, abréviation de *'fertility inhibition négative'*

Pratiquement, un facteur sera dit type $R\ f_i^+$ si, introduit dans une souche F_i^+ , normalement sensible aux phages antimâles, il rend cette souche insensible, en inhibant la synthèse des F pili où se fixent ces phages.

Certains auteurs ont par ailleurs démontré qu'une même bactérie ne pouvait héberger de façon stable deux plasmides de types différents (8). Dans certains cas, la coexistence stable de deux ou plusieurs plasmides de type $R\ f_i^-$ a été observée. Cette compatibilité prouve que la classe $R\ f_i^-$ n'est pas homogène. (30).

Il semble que les phénomènes d'incompatibilité entre facteurs R soient un moyen valable de classification des plasmides. En effet, les gènes responsables de ces phénomènes ont sans doute une importance capitale dans la réplication des plasmides et la distribution des copies dans les bactéries filles.

L'incapacité à coexister dans une même bactérie est due probablement à une compétition pour un site de réplication (14).

B - Par hybridation

GRINDLEY et ANDERSON (44) ont pour leur part effectué des études d'hybridation des brins d'ADN.

La méthode consiste à marquer différemment chaque plasmide (l'un avec du tritium ^3H , l'autre avec ^{14}C), puis à séparer les brins d'ADN par dénaturation alcaline et après ré-hybridation des brins de plasmides différents, d'apprécier le degré d'homologie par des mesures de radioactivité sur filtre ou par une visualisation au microscope électronique. Les résultats obtenus prouvent qu'il existe une homologie génétique étroite entre les plasmides de même groupe. Enfin, il semble que la longueur des plasmides d'un même groupe d'incompatibilité est relativement voisine.

CHAPITRE IV

PROPRIETES des PLASMIDES

.

A - STRUCTURE GENETIQUE D'UN PLASMIDE

Le chromosome bactérien est une molécule circulaire continue qui se divise en une cinquantaine de régions ; chaque région a la forme d'une boucle et chaque boucle est surenroulée un certain nombre de fois. WORCEL a émis l'hypothèse du maintien de ces boucles par un "noyau" d'ARN (50).

(Figure.I page 10 et schéma page 19).

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire et correspondent à la forme I du DNA (C. C. C. DNA ou 'covalently closed circular DNA'). Ils présentent des analogies structurales et fonctionnelles avec le chromosome bactérien ; ils sont "sur-enroulés", mais ne comportent bien entendu qu'une région(21).

Les plasmides sont capables d'auto-réplication (cf.hypothèse du réplicon JACOB-BRENNER) et peuvent souvent assurer leur propre transfert par conjugaison.

Toutefois, plusieurs caractères fondamentaux différencient plasmides et chromosomes :

- Les plasmides sont de petites molécules dont la

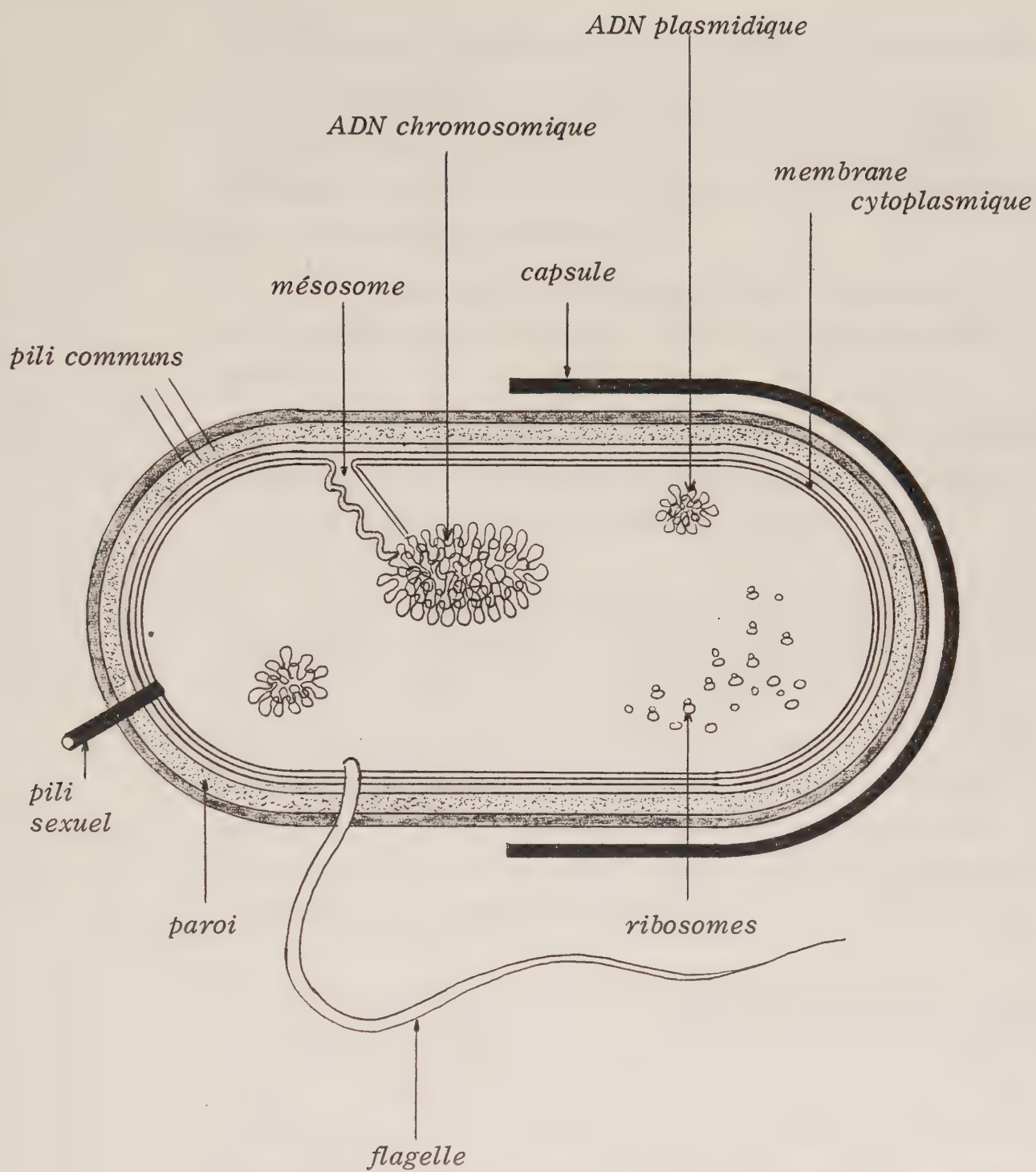


Schéma de la structure bactérienne.

taille représente, au plus un à 3 pour cent du chromosome (85).

- Les plasmides contrôlent des propriétés qui ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie ; ils confèrent seulement à cette dernière des avantages sélectifs importants dans des conditions déterminées.

- La majorité des plasmides est transférable entre bactérie de même espèce, voire même d'espèces différentes.

- Les plasmides ont une propriété structurale particulière : leurs molécules sont super-enroulées (supercoiled), propriété dont l'importance apparaîtra plus loin.

D'après le poids moléculaire des plasmides, on peut penser que ces structures possèdent plusieurs dizaines de gènes pouvant coder autant de caractères (19). Ainsi, par exemple, une protéine formée de 400 acides aminés sera codée par 1200 paires de nucléotides ; or, un plasmide de poids moléculaire égal à 40×10^6 Dalton possèdera environ 12×10^4 paires de nucléotides (24). Ce qui signifie que 100 protéines différentes pourraient être codées par ce plasmide.

Les différents gènes portés par un plasmide peuvent être regroupés en trois catégories :

a) un opéron de transfert le plus souvent assez volumineux, occupant le tiers ou la moitié du plasmide et comprenant les gènes de transfert (gènes pour la synthèse des pili, l'exclusion d'entrée, la réplication et le métabolisme de l'ADN, le contrôle positif de l'expression de l'opéron).

b) des gènes de résistance à différents antibiotiques ou antibactériens pour le plasmide R(105).

c) des gènes dont la fonction n'est pas détectée.

B - DIFFERENTS ETATS des PLASMIDES

Les différents gènes, responsables de la résistance aux antibiotiques ou du transfert ne coexistent pas forcément sur le même plasmide. Ainsi une souche peut transférer ses déterminants indépendamment durant le processus de conjugaison et à des fréquences variables ; mais les bactéries ayant reçu le déterminant transmis à la plus faible fréquence peuvent le transmettre elles-mêmes à très haute fréquence (93).

ANDERSON (4) émit l'hypothèse de l'existence d'un plasmide Δ portant la fertilité et d'autant de plasmides différents que de déterminants transmettant une résistance. Le déterminant transmis à faible fréquence forme avec le plasmide Δ une structure stable lorsqu'il entre en interaction.

Ce modèle prévoit donc des plasmides indépendants de tout facteur de résistance et des facteurs R incapables de se mobiliser. Des facteurs incapables de se mobiliser ont été effectivement trouvés et ont ainsi prouvé l'existence des facteurs Δ .

Ces facteurs Δ peuvent être assimilés à des opérons

de transfert et on a pu déterminer leurs poids moléculaires.
Chez *Salmonella typhimurium* :

$$\begin{aligned} P.M \text{ de } \Delta &= 60 \times 10^6 \\ P.M \text{ de } R \text{ (Ampi)} &= 6 \times 10^6 \\ P.M \text{ de } R \text{ (Sm)} &= 6 \times 10^6 \\ P.M \text{ de } \Delta R \text{ (Tetra)} &= 67 \times 10^6 \end{aligned}$$

(voir tableau des abréviations page 134)

ANDERSON a montré que 63 % des *Salmonelles* apporteraient ce facteur Δ (4). Pour cela, il a utilisé l'expérience dite "du mariage à trois" (50) : un mélange contient une bactérie A sensible à tous les antibiotiques et dont on cherche à démontrer si elle porte le facteur Δ ,
une bactérie B portant un facteur R incapable de transfert qui la rend résistante à X et
une bactérie C sensible à l'antibiotique X et portant un marqueur sélectif lui permettant de pousser sur un milieu où A et B ne peuvent pousser. Ce mélange est ensemencé sur le milieu sélectif contenant X, l'apparition de colonies indique la présence d'un facteur dans A. La séquence des événements est la suivante :

$$\begin{array}{lcl} A (\Delta) & + & B (R) \quad \text{_____} \quad B (\Delta R) \\ B (\Delta R) & + & C \quad \text{_____} \quad C (\Delta R) \end{array}$$

Avec une autre méthode, ANDERSON montre que 25 % des *Escherichia coli* porteraient ce facteur Δ (4).

CHAPITRE V

TRANSFERT des PLASMIDES

Ce caractère fait partie des propriétés des plasmides. Nous le mettrons cependant à part, étant donné son importance.

Le transfert des plasmides est étudié dès 1960. Des expériences très diverses ont été effectuées par OCHIAI, AKIBA, MITSUHASHI et WATANABE (90). Deux grands mécanismes de transfert sont décrits : la conjugaison et la transduction(112).

A - LA CONJUGAISON

Ce phénomène implique l'union entre une bactérie mâle et une bactérie femelle suivie du passage des éléments génétiques autonomes. L'efficacité de la conjugaison est appréciée par la fréquence de transfert (93) définie par le rapport :

$$\frac{\text{nombre de bactéries réceptrices ayant reçu le facteur R}}{\text{nombre de bactéries donatrices}}$$

La conjugaison nécessite une modification préalable de la paroi bactérienne et la présence de pili. Il existe en effet, plusieurs différences chimiques et sérologiques entre les donneurs et les accepteurs. La différence la plus frappante (découverte en 1964 par le microscope électronique) est la présence chez le donneur de poils spécifiques appelés pili (69). Ces pili

ont un rôle important dans la conjugaison et sont composés par la polymérisation d'une seule sous-unité protéique qui porte des résidus phosphate et glucose (50).

Le diamètre de ces pili est égal à 85 Å et présente un canal central de 20-25 Å. Il n'est pas évident que ce canal central serve au transfert du matériel génétique, mais ces poils sexuels seraient des "cables d'amarrage"; le transfert génétique se ferait à travers un pont cytoplasmique(11).

Les relations existant entre les pili dépendant génétiquement des facteurs R et les pili déterminés par les autres plasmides ont été étudiées par MEYNEL et DATA (69)(70). Deux classes de pili ont été ainsi déterminées :

les F like pili

les I like pili.

Les F like pili sont comparables à ceux produits par le facteur sexuel F et leur taille est de 1 à 20 nm. On observe d'autre part pour les F like pili un phénomène de reconnaissance par des phages spécifiques (31) :

phage à ARN MSII

phage filamenteux à ADN f.

Ces phages s'adsorbent spécifiquement sur les poils sexuels et lysent donc spécifiquement les donneurs.

Les I like pili sont analogues aux pili induits à la surface des cellules par le facteur colicinogène. Leur longueur est environ de 2 nm et il existe une reconnaissance par un phage filamenteux If1.

Actuellement, l'appariement d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice s'explique par un phénomène beaucoup plus complexe qui nécessiterait des agrégats pouvant aller jusqu'à 50 cellules ou plus et dans lesquels de nombreux donneurs et receveurs sont en contact paroi à paroi (22).

L'interaction entre la cellule donneuse et receveuse impliquerait l'interaction entre un pili F et une protéine réceptrice inconnue à la surface de la cellule receveuse (96) ; puis un récepteur inconnu à la surface du donneur réagirait avec la protéine de membrane à la surface de la cellule réceptrice. Les agrégats formés seraient très compacts, mais dès que les facteurs sexuels seraient transférés, ils pourraient de nouveau facilement se dissocier (ACHTMAN) (1).

Il semble qu'il existe une différence essentielle dans la fréquence avec laquelle sont transférés les facteurs sexuels F et les facteurs R. La fréquence de transfert est basse dans une culture où le facteur R est établi depuis longtemps : 10^{-2} par donneur et par heure (93). Pour F, la fréquence de transfert atteint 100 %. Des observations au microscope électronique suggèrent que la basse fréquence du transfert du facteur R de ces cultures est due à une capacité réduite de synthétiser des pili.

Au contraire, les bactéries nouvellement infectées par le plasmide de résistance présentent une fréquence de transfert très importante ; ces cultures sont nommées "high frequency resistance transfer", mais voient après quelques divisions diminuer le nombre des pili ainsi que la capacité de transfert (22). Il existerait donc un système de régulation de la synthèse des pili du type répresseur-opérateur (11), (un répresseur s'accumulerait dans les cultures anciennes et réprimerait la synthèse des pili).

Les relations entre plasmides F et plasmides R

Ces notions ont déjà été abordées à propos de la classification des plasmides. L'éventail de possibilité entre la situation où deux plasmides s'excluent et celle où ils peuvent coexister d'une manière stable est relativement large. Il semble que plus deux plasmides sont évolutivement proches et moins ils peuvent coexister (22); inversement, plus ils sont différents, plus ils "s'ignorent".

La synthèse des pili étant soumise à une régulation par un système de régulateur-opérateur, il semble exister deux types de répresseurs correspondant aux types de pili (11).

Ainsi, un plasmide de R_{fi}^- ne diminue pas la fertilité de F, car le plasmide synthétise un répresseur qui n'inhibe pas la synthèse des pili codés par F.

D'autre part, un plasmide Rfi^+ inhibe la fertilité du plasmide F, car il synthétise un répresseur de type F.

B - TRANSDUCTION

Les plasmides peuvent également être transférés par transduction et c'est parfois le seul moyen de passage d'un plasmide (staphylocoque).

Certains phages transduisent un plasmide entier ; c'est le cas du phage P1 (31). D'autres phages ne transduisent qu'un fragment de plasmide (le plasmide est défectif), c'est le cas des phages P_{22} et λ .

Lors de la transduction, l'ADN du plasmide est incorporé dans la "tête" du phage et injecté avec l'ADN phagique dans la bactérie recevant le bactériophage.

CHAPITRE VI

QUELQUES EXEMPLES DE PLASMIDES

A - Plasmides porteurs uniquement des caractères de fertilité (épisode F d'*Escherichia coli* K 12 (25))

Cet élément génétique détermine chez cette bactérie le type sexuel mâle. A l'état autonome, il peut se répliquer et constitue donc un réplicon ; sa taille est environ le centième de celle du chromosome et il contient l'information nécessaire à l'élaboration de plusieurs dizaines de protéines. Ce plasmide gouverne deux grands types de fonctions : d'une part la sexualité et le transfert de gènes, d'autre part les fonctions qui commandent la multiplication autonome.

Il peut arriver dans certains cas que l'épisode F au cours de sa désintégration du chromosome, prenne un fragment du génome bactérien ; il prend alors le nom de facteur F' qui conserve toutes les propriétés de F et transfère en plus les gènes de la bactérie précédente : ce phénomène se nomme la sexduction (50).

Les facteurs F' sont utilisés pour l'étude des facteurs F ; ainsi les F lac ou F gal portent des caractères facilement repérables et servent de marqueurs.

Enfin, les facteurs F' sont utilisés pour former des diploïdes stables et l'utilisation d'une bactérie incapable de

se recombinaison (rec -) évite la recombinaison trop fréquente du fait de la similitude des réplicons (84).

B - Plasmides de résistance aux agents antibactériens

1) Les antibiotiques. Nous reviendrons plus en détail, un peu plus tard et à propos du bacille pyocyane, sur ce type de plasmide. La résistance à un antibiotique donné est contrôlée par un déterminant génétique qui est incapable de se transmettre par lui-même à une autre bactérie. La transmission ne peut se faire que si ce gène est associé à des gènes de transfert.

Ces facteurs R codent pour la résistance à de nombreux antibiotiques, tels que le sulfanilamide, la streptomycine, le chloramphénicol, la tetracycline, la pénicilline, le nitrofurane, la kanamycine, la néomycine, la gentamicine, la spectinomycine, la viomycine...

Le mécanisme de résistance dû à ce facteur R est le plus souvent de nature enzymatique (inactivation de l'antibiotique), mais il peut être lié dans certains cas à la production d'une protéine de membrane/paroi, diminuant la perméabilité à l'antibiotique.

2) Les métaux lourds (Cadmium, Mercure...)

Le caractère de résistance aux métaux lourds (100)

comme le mercure est souvent associé à des caractères de résistance aux antibiotiques et parfois même à des facteurs sexuels F.

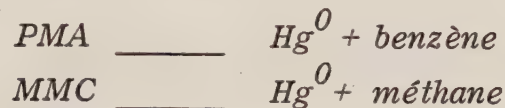
Ces gènes de résistances possèdent une homologie génétique considérable avec les facteurs R responsables de la résistance aux antibiotiques. Par exemple, dans le genre Pseudomonas, il existe trois groupes (16) de plasmides entraînant une résistance au mercure : le premier groupe comprend des facteurs F associés à des gènes de résistance au mercure, le second des facteurs R et des gènes de résistance au mercure, le dernier comprend deux plasmides portant uniquement la résistance au mercure (plasmides MER et Hg-r) (CHAKRABARTY).

Les plasmides de résistance au mercure codent pour des enzymes qui réduisent le mercure inorganique en mercure métallique ainsi volatilisé des cellules (109) (104).

SCHOTTEL et SILVER (16) ont ainsi montré qu'un certain nombre de souches de bacille pyocyanique et d'Escherichia coli réduisait le Hg^{2+} en Hg^0 grâce à des plasmides également responsables de résistance à certains antibiotiques.

Certains de ces plasmides ne déterminent une résistance qu'au mercure inorganique, tandis que d'autres codent pour une résistance aux organomercurels.

Ainsi, les plasmides FP_2 et R_{3108} (CHAKRABARTY) de *Pseudomonas aeruginosa* (110) confèrent la capacité de volatiliser le mercure du chlorure méthyl mercurique (MMC), du nitrate mercurique ou de l'acétate phényl mercurique (P.M.A.), selon le schéma suivant :



Les enzymes spécifiques codées par ces plasmides ont été purifiées et caractérisées chez *Escherichia coli*, l'activité de réduction du mercure inorganique est localisée dans le cytoplasme et exige du NADPH et du 2 mercapto-éthanol, de sorte que le PMA ou le MMC ne pourraient être réduits en Hg^0 en dehors de la cellule, bien que l' Au^{3+} soit réduit en or colloïdal métallique par ce seul système enzymatique.

Les expériences de SUMMER et TONOMURA (104) (110) ont démontré que le bacille pyocyanique, doué de propriétés de résistance au mercure, perdait cette capacité de résistance par traitement à la mitomycine C, agent curant, (mais parfois aussi mutagène) des plasmides de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui démontre la nature plasmidique de ces gènes.

3) Plasmides porteurs de facteurs de virulence ou de pathogénicité

Certains plasmides (49) peuvent conférer à des bactéries qui en sont porteuses des propriétés telles que la

production d'hémolysines (plasmide Hly d'*Escherichia coli*)
d'entérotoxine (plasmide K 88 plasmide KCo, plasmide Ent
d'*Escherichia coli*) ou encore l'apparition de facteur de viru-
lence (plasmide Col, plasmide V d'*Escherichia coli*).

4) Plasmides déterminant la synthèse de substances
antibactériennes

a) des antibiotiques : la production d'antibiotiques
par *Streptomyces coelicola* serait codée par un élément génétique
plasmidique (32).

b) des bactériocines. Les bactériocines (83) sont
des substances synthétisées par certaines bactéries qui sont
actives contre d'autres bactéries de la même espèce ou d'espèces
voisines. Ce ne sont pas des antibiotiques, mais des protéines
de très haut poids moléculaire (col $E_2 P_9 = 60000$) ayant une
très haute spécificité d'action. Les mégacines sont des bacté-
riocènes de *Bacillus megaterium*, les colicines des bactériocines
d'*Escherichia coli*. Elles sont assez complexes, puisque ces
dernières sont classées selon le schéma de FREDERICQ (38)
en groupes et en sous-groupes. Les groupes sont déterminés
en fonction de la spécificité du récepteur sur lequel se fixent
les colicines (groupes B, E, I, K) ; les sous-groupes sont
déterminés en fonction de la spécificité de l'immunité (E_1 ,
 E_2 , E_3).

5) Plasmides déterminant la synthèse d'enzymes agissant sur l'ADN

Le plasmide RY 13 d'Escherichia coli (35) coderait pour la synthèse d'endonucléases et de méthylases.

6) Plasmides métaboliques

La connaissance de ces plasmides a contribué de façon importante à la compréhension de la "versatilité nutritive" des *Pseudomonas* et donc à l'explication de leur survie dans des conditions peu favorables. Les éléments génétiques peuvent intervenir dans le métabolisme des glucides ou des hydrocarbures cycliques.

Il faut d'ailleurs noter que la distinction entre plasmides métaboliques et plasmides de résistance est arbitraire, parce que basée sur les substrats sur lesquels agissent les enzymes codées par ces plasmides (18). S'il s'agit d'une β -lactamase, on parlera de plasmide de résistance, s'il s'agit de β -galactosidase, on parlera de plasmide métabolique. D'ailleurs, certains plasmides hébergent à la fois un caractère métabolique et un caractère de résistance.

Les plasmides responsables du métabolisme des disaccharides (lactose ou saccharose) sont plutôt rares et pourraient représenter la recombinaison assez peu fréquente de gènes chromosomiques avec d'autres réplicons. Ces plasmides apparaissent souvent chez Pseudomonas putida (7) (91) et

sont transmissibles à un grand nombre d'espèces de *Pseudomonas*. Ils présentent des systèmes de régulation spécialisés, de telle sorte qu'ils ne se répliquent pas à 42°C ou ne sont pas transcrits à cette température. WHEELIS a suggéré que l'échec de réplication ou de transcription à cette température pourrait être attribué à une traduction défectueuse due à une dégradation rapide de l'ARN messager; dans cette hypothèse, ce plasmide pouvait être l'élément génétique spécifique de l'ARN polymérase () et il s'agirait d'un aspect de la régulation de l'expression des plasmides cataboliques de *Pseudomonas*.

D'autres plasmides sont responsables de la dégradation des hydrocarbures cycliques (CAM, OCT, SAL, XYL) (17) (42), (voir tableau des abréviations). Ainsi certaines souches de *Pseudomonas* sont capables d'utiliser du para ou du métaxylène et ces mêmes souches perdent cette propriété en présence de mitomycine C.

Les gènes déterminants les enzymes sont sans doute portés par un plasmide qui ne peut être transféré qu'en présence d'un facteur K (16). Ce plasmide responsable de la dégradation du xylène est compatible avec tous les autres plasmides dégradateurs ; de plus, il semble que la voie "xylène" soit inductible, ce qui suggère le cotransfert des gènes régulateurs avec le plasmide (27) (28).

La responsabilité du plasmide dans cette voie métabolique était encore récemment obscure et c'est l'étude des

intermédiaires métaboliques qui a permis de préciser cette base génétique. FRIELLO et MYLROIE (41) ont utilisé différentes méthodes d'expérimentation : (essais d'enzymes, méthodes analytiques de consommation d'oxygène par polarographie, curage de la voie "xylène", expériences de transfert, de transduction, d'essais de compatibilité et induction d'enzymes). Il en résulte que la capacité de certaines souches de se développer avec de l'octane, du camphre, du salicylate, du naphthalène ou du toluène peut se perdre spontanément et la fréquence de perte est augmentée ici aussi en présence d'agents, tels que la mitomycine C, ce qui confirme le rôle d'un plasmide dans ce métabolisme. En effet, les cellules, qui ne pouvaient pas utiliser le xylène par exemple (33) comme substrat de croissance, perdent également par ce "curage" la possibilité de catalyser certaines liaisons du noyau aromatique.

Par exemple, le plasmide XYL (41) de *Pseudomonas* métabolise le para ou le méta-xylène en les oxydant et en entraînant la formation intermédiaire d'alcool et d'acides toluïques ; cette opération s'effectue sous le contrôle de protéines régulatrices induites (une paraxylène oxygénase et une alcool déshydrogénase).

7) Plasmides cryptiques

Lors de l'isolement physico-chimique de plusieurs plasmides de *Pseudomonas aeruginosa* ou de *Pseudomonas putida*, des petites molécules de CCCDNA furent mises en évidence mais sans que l'on puisse leur attribuer une fonction connue (16).

Ces éléments génétiques circulaires sont appelés "plasmides cryptiques". Ainsi d'une souche de Pseudomonas hébergeant le plasmide R 931 du groupe P_2 , il a été isolé des petits fragments d'ADN circulaire ne contrôlant aucune propriété connue.

CHAPITRE VII

RELATION PLASMIDE-CHROMOSOME

I - La recombinaison

La recombinaison génétique est l'association de deux éléments génétiques. Un fragment de plasmide peut s'intégrer au chromosome suivant deux processus :

- la recombinaison classique*
- la recombinaison illégitime.*

Outre l'intérêt fondamental de cette connaissance, ce phénomène permet à l'heure actuelle d'espérer la naissance d'un véritable "engineering génétique" (M. HOFNUNG).

La combinaison des plasmides (facteurs R) avec le chromosome est importante pour la connaissance de l'évolution de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.

Nous ne rappellerons que les études qui ont porté plus particulièrement sur les facteurs R de Pseudomonas; notamment ceux qui appartiennent au groupe d'incompatibilité P_1 .

1) La recombinaison classique

Elle est attribuée à une interaction entre des molécules d'ADN homologues et elle nécessite une homologie importante

entre les ADN qui se soudent et la présence d'un gène *rec A* (84). Une souche qui possède ce gène favorise l'induction du prophage, ne permet pas l'intégration d'un plasmide, et ne peut transmettre ce plasmide à une autre bactérie ; elle ne peut transmettre le chromosome (MOODY) (84).

2) La recombinaison illégitime

Ce second processus permet la recombinaison (61) illégitime d'éléments transposables *Tn* (transposons contenant un gène de résistance bordés de séquences d'insertion permettant une fixation facile sur un ADN étranger). Voir figure et tableau page 42).

Parmi les plasmides P_1 , RP_1 a été particulièrement employé à cause d'un segment translocable *TnA*, c'est-à-dire un gène qui code pour la résistance à l'ampicilline. Le *TnA* (ou *Tn1*) permet le transfert du gène de résistance à l'ampicilline d'un réplicon à l'autre. (80).

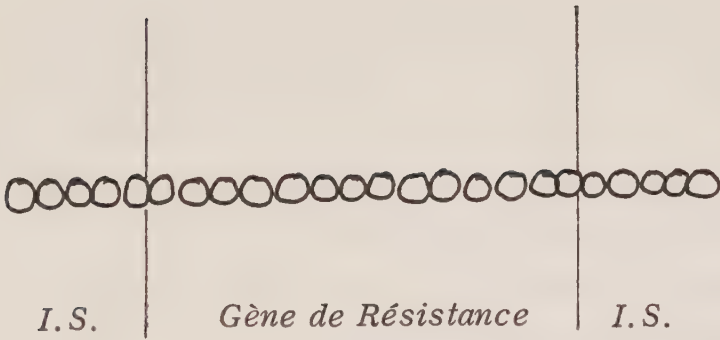
On sait d'autre part que le *TnA* est capable de s'intégrer au chromosome d'Escherichia coli et qu'il peut être détaché de son site chromosomique par un plasmide "super infectant", tel que *F''* ; cette opération permet le transfert de régions génétiques adjacentes au site d'intégration de *TnA*. (22).

Le *TnA* est un gène codant la β -lactamase dont le type le plus courant est la B-lactamase TEM. La présence du gène β -lactamase dans le plasmide RP_1 du groupe P_1 a récemment

LISTE des TRANSPOSONS (Starlinger 1976)

	<i>longueur totale en kilobases (Kb)</i>	<i>gènes de R</i>	<i>longueur IS (Kb)</i>	
<i>TnA</i>	4,4	<i>Ampi</i>		0,15
<i>TnT</i>	3,8	<i>Tetra</i>	<i>IS3</i>	1,4
<i>TnK₁</i>	5,2	<i>Kana</i>	<i>IS2</i>	1,34-1,39
<i>TnK₂</i>	4,1	<i>Kana</i>		
<i>TnC</i>	2,6	<i>Chloramph.</i>	<i>IS1</i>	0,73

d'après STARLINGER et SAEDLER (1976) (102).



été démontrée par la transformation d'un réplicon à un autre. La transposition de ce gène de RP_4 au plasmide R_{64} du groupe I a été observée par DATTA et coll. (29) et la transposition de ce gène sur le chromosome d'*Escherichia coli* par RICHMOND et SYKES (97). De plus, la transposition du caractère résistance à la carbénicilline sur des plasmides comme JR66a ou Sa ayant été démontrée par HEDJES et DATTA (30) malgré une homologie génétique peu importante entre Sa et RP_4 , il semble que ce phénomène puisse se dérouler en l'absence d'homologie génétique significative; cependant, tous les réplicons ne peuvent être des accepteurs de transposition.

Lorsqu'on observe une transposition, la taille des plasmides varie entre $1,7$ et $3,9 \times 10^6$ Daltons ; si dans une cellule résistante à l'ampicilline aucune molécule de CCC DNA entre 2 et 4×10^6 Daltons n'est détectée, on peut en conclure que la transposition a compris l'insertion de la série de l'ADN dans le réplicon chromosome. En d'autres termes, le plasmide hébergeant le TnA est incapable de se répliquer seul (22).

Ce transposon est présent dans un grand nombre de plasmides de type R appartenant à de nombreux groupes d'incompatibilité. On pouvait en conclure que les facteurs R spécifiant la β -lactamase TEM apparaissaient à la suite de translocation de cette série d'ADN de plasmide en plasmide.

La taille des segments d'ADN suggère qu'ils codent pour 6 à 7 protéines en plus de la β -lactamase TEM (80).

II - Plasmides vecteurs de gènes

Certains plasmides peuvent être transmis à de nombreuses espèces bactériennes (Escherichia coli, Proteus, Pseudomonas, Neisseria, Rhodopseudomonas, Azobacterium, Rhizobium...). RP_4 et RK_2 en sont des exemples et sont coupés en un site unique par une enzyme, l'endonucléase $EcoR_1$. Ces plasmides acceptent à ce niveau un fragment d'ADN étranger et deviennent ainsi vecteurs de gènes. Ensuite, ces plasmides vont soit se répliquer de façon autonome, soit ne pas se répliquer et être dilués lors de la croissance bactérienne. Pour que cet ADN échappe à la dégradation lors de l'entrée dans la bactérie, il devra comporter les modifications qui le rendront insensible au système de restriction de l'hôte (10). Le phénomène de restriction-modification est dû à deux enzymes : une endonucléase et une méthylase ; la méthylase de modification méthyle certains sites et empêche ainsi l'endonucléase de restriction (5) (35).

Deux systèmes de RM (restriction-modification) (10) existent : le type I chez Escherichia coli et le type II qui se retrouve lorsqu'un facteur R est introduit dans une souche. (voir tableau page 45).

Type	Origine	Spécificité	Masse moléculaire approximative ($\times 10^{-3}$)	Cofacteur		
				ATP	SAM	Mg ⁺⁺
I	<i>E. coli B</i>	B	300 à 450	+	+	+
I	<i>E. coli K</i>	K	400	+	+	+
II	Facteur R _I	R _I	80	-	-	+
II	Facteur R _{II}	R _{II}	100	-	-	+
proche de I	Phage P ₁	P	200	+	+	+
II ?	<i>Heamophil.</i>	<i>Heamophilus</i>	70	-	-	+

TABEAU DES PROPRIETES D'ENDONUCLEASES DE RESTRICTION DE TYPE I
ET DE TYPE II SELON HOFNUNG (50).

CHAPITRE VIII

REPLICATION des PLASMIDES

Nous développerons quelque peu ce chapitre, car les difficultés d'isolement du plasmide 56 Be qui est le sujet de notre travail sont directement liées aux relations plasmides/chromosome que nous avons étudiées précédemment. Elles sont liées à une réplication sinon difficile, du moins particulière à cet ADN.

A - ORIGINE de la REPLICATION

La réplication conduit à la synthèse de nouvelles molécules d'ADN plasmidique réparties dans les bactéries filles après la division bactérienne. La réplication du plasmide est autonome (expérience de thermosensibilité à 42°C ou de "cure").

Les plasmides portent des structures génétiques intervenant spécifiquement dans leur propre réplication (le "réplicateur" et "l'initiateur").

De nombreuses expériences (88) montrent que le cycle de réplication commence en un seul point et progresse séquentiellement à partir de cette "origine de réplication" (72).

Les gènes proches de l'origine seront en concentration deux fois plus élevée que les gènes proches du point de terminaison.

B - EVOLUTION de la REPLICATION

Le mécanisme de réplication des plasmides n'est pas spécifique au plasmide. Le mode de réplication peut être unidirectionnel ou bidirectionnel selon l'hypothèse de la circularité du plasmide. Deux modèles de réplication ont été proposés (72) :

a) le modèle de CAIRNS

A partir de l'origine fixe de réplication, le phénomène s'effectue progressivement à partir de ce point.

(figure I, page 49).

Au microscope électronique, après le début de la réplication, on peut observer des figures en forme de V. Le point de réunion des deux branches du V correspondrait à l'emplacement de la fourche de réplication. Les deux branches représentent les portions des deux nouvelles molécules d'ADN synthétisées.

b) le modèle du "cercle roulant"

(rolling-circle model)

Il semble également que la réplication puisse s'effectuer dans deux directions à partir du point d'initiation.

(figure II, page 49).

Il s'agit d'un processus asymétrique. Un des brins

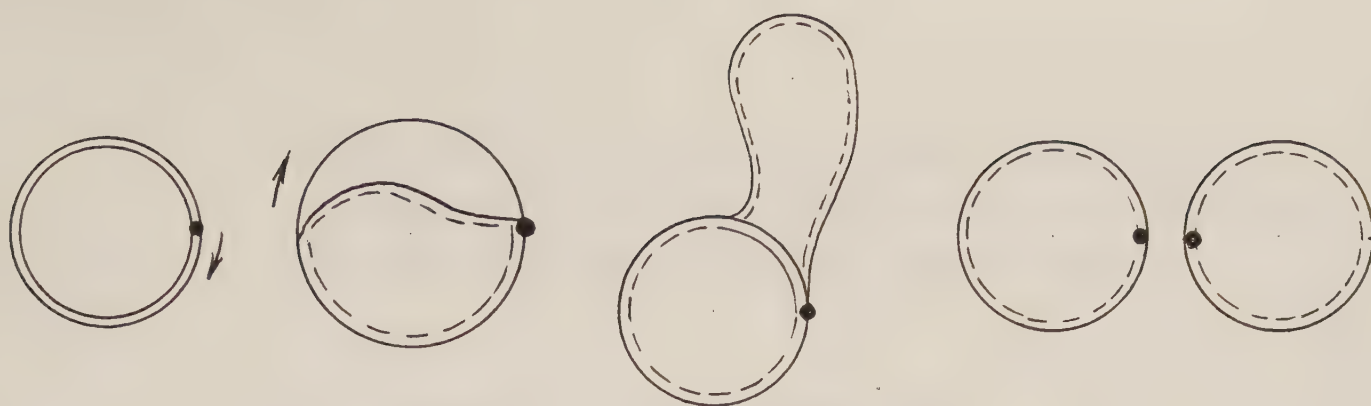


Fig. I : Le modèle de CAIRNS (72).

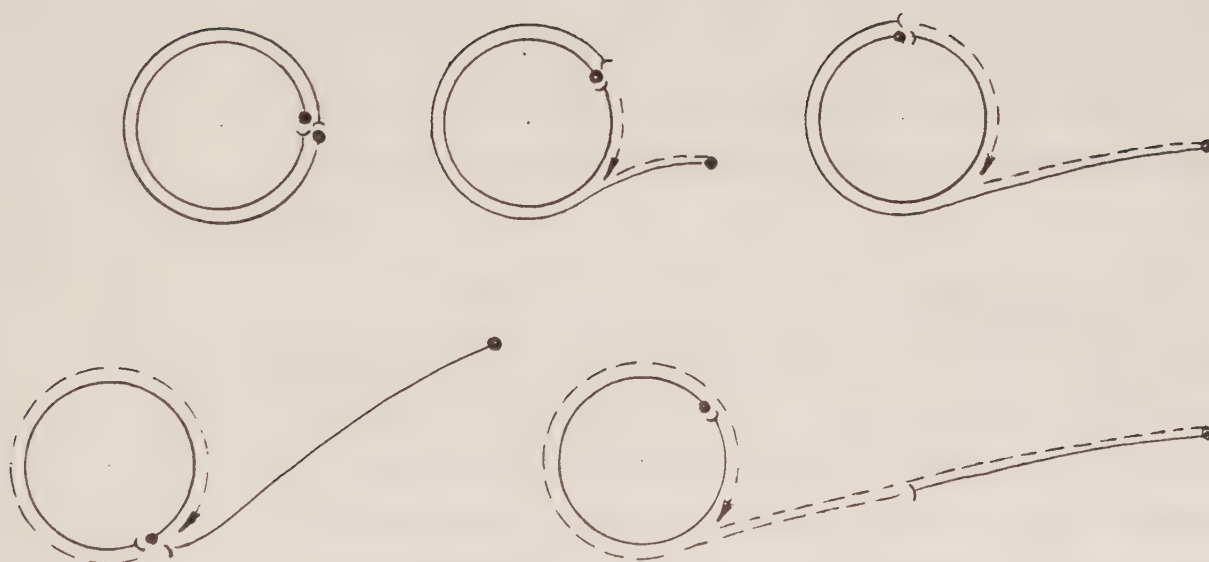


Fig. II : Le modèle du "cercle roulant" (rolling-circle model) (72).

d'ADN s'ouvre, tandis que son extrémité 5' s'attache à la membrane. La réplication s'effectue sur le brin ouvert et sur le brin fermé de manière à obtenir deux monomères.

C - CONTROLE de la REPLICATION

Nous avons déjà précisé que les plasmides sont des structures génétiques capables d'autoréplication. Le plus souvent, cette réplication est indépendante du contrôle de la réplication du chromosome de la cellule.

L'hypothèse du réplicon de JACOB et BRENNER fournit une explication du contrôle de la réplication du plasmide. Les deux éléments, le gène de structure (initiateur) et l'opérateur de réplication (réplicateur), sont spécifiques ; lorsque le processus de réplication est amorcé, toutes les séquences attachées au réplicateur sont répliquées. Le système de régulation de la réplication doit donc agir sur ces deux éléments (52).

D'autre part, la liaison de la réplication avec un signal cellulaire pose le problème des rapports du plasmide avec la membrane bactérienne (99). Il est généralement admis qu'il y a attachement du plasmide en un point de la membrane qui contrôlerait les signaux permettant la réplication du chromosome et des plasmides. A la formation du septum, la cellule réaliserait la distribution équitable du matériel génétique. La région qui se réplique serait attachée à quelques molécules de haut poids moléculaire.

Mais, les rapports de la membrane et du plasmide ne doivent pas découler de processus simples. Il est en effet difficile d'imaginer que la membrane porte des sites spécifiques pour chaque plasmide, afin de réguler chaque réplication.

D - ANOMALIES de REPLICATION

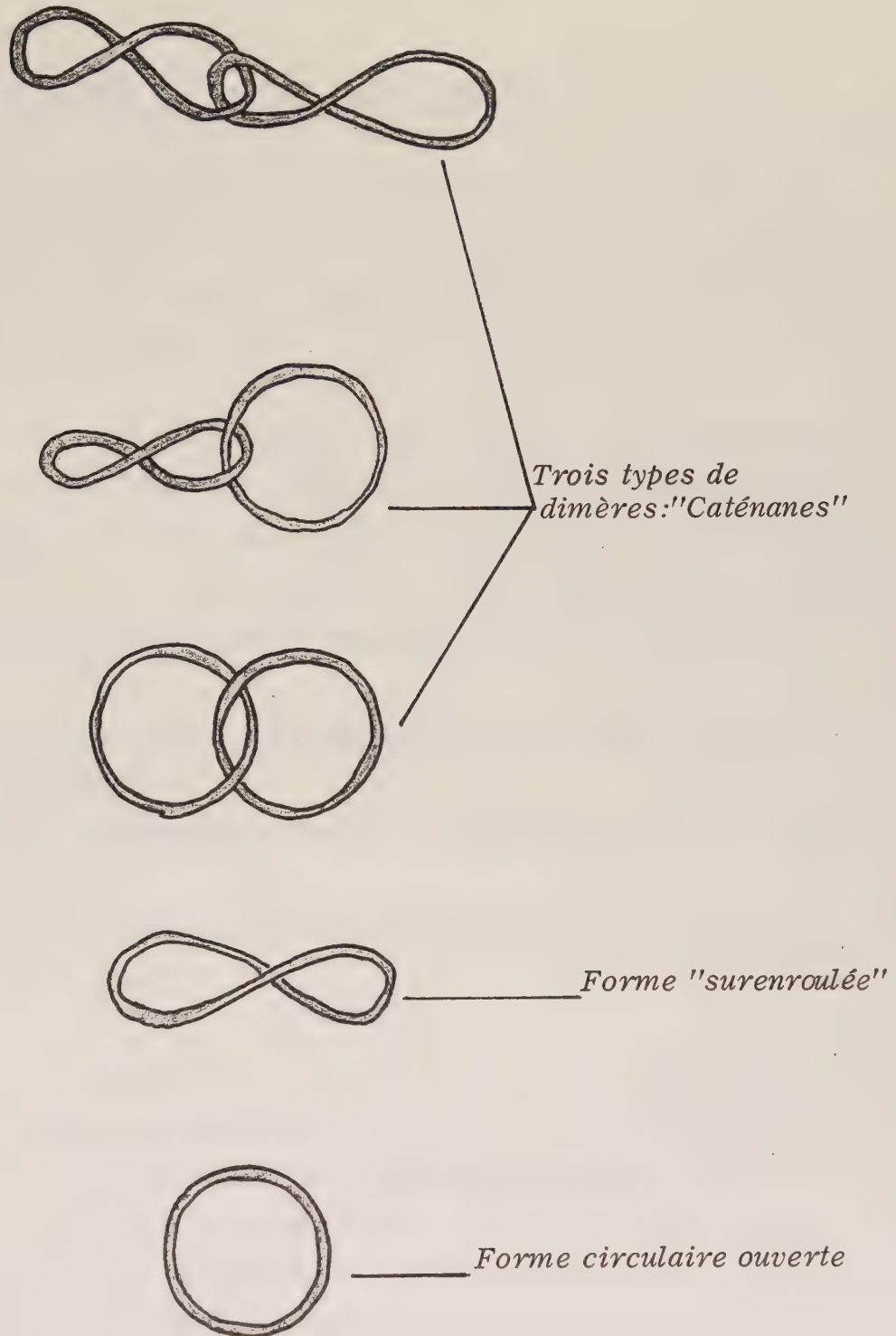
Certaines anomalies de la réplication des plasmides permettent dans une certaine mesure d'expliquer les difficultés rencontrées dans les techniques de séparation de ces plasmides (88)

L'ADN plasmidique est le plus souvent monomère linéaire ou circulaire, mais dans les deux cas, il ne contient qu'un seul génome. Il existe pourtant des polymères appelés catenanes et concaténates. MEYNEL (72) en donne les définitions suivantes :

concaténates : oligomères linéaires ou circulaires

catenanes : plasmides arrangés en maillons de chaîne.

Pour distinguer un monomère d'un oligomère, on provoque la scission des molécules, afin de les réduire à quelques centaines de nucléotides ; puis la séparation effectuée, on calcule un pourcentage de recombinaison. La théorie prévoit en effet que le temps nécessaire à la recombinaison de 50 % des brins est proportionnelle à la taille de leur génôme (20) : une quantité d'ADN dérivant d'un petit génôme contient beaucoup plus de répétitions de séquences identiques de base qui se réassocient plus rapidement que la même quantité provenant d'un plus grand génôme. (Figure page 52).



DIFFERENTES STRUCTURES DE L'ADN PLASMIDIQUE
SELON BOUANCHAUD (9).

E - NOMBRE de COPIES par CELLULE

Le nombre de copies de plasmides par cellule varie dans une assez large mesure (23) et les causes de ces différences sont encore peu connues : (une à soixante copies par cellule ont pu être observées).

L'état physiologique de la bactérie est un facteur de variation du nombre des copies ; le plasmide R TEM d'Escherichia coli présente en phase exponentielle de croissance 13 copies par chromosome (état "stringent"), alors qu'en phase stationnaire (45) 38 copies par chromosome sont observées (état "relax").

RP₁ dans Pseudomonas aeruginosa P₁₈ représente 1 à 2% de l'ADN total

RP₁ dans Escherichia coli EC 1005 représente 3 à 5% de l'ADN total

RP₁ dans Proteus mirabilis peut représenter jusqu'à 12% de l'ADN total.

CRESS (23) a montré que des mutants chromosomiques d'Escherichia coli qui donnent une augmentation du nombre des plasmides F' (2 à 7 fois plus), pouvaient également perdre la forme CCC DNA par un mécanisme inconnu ; il y aurait alors intégration dans le chromosome. Il ne semble pas que l'explication puisse provenir d'une liaison avec la membrane, car la fraction 1800 S qui contient ces plasmides est justement dépourvue de membrane.

Ces mutants sont appelés pcn 24 et leur phénotype serait l'intégration ou la non intégration du plasmide, ce phénomène étant sous la dépendance d'un locus chromosomique ; la capacité de maintenir des copies multiples serait très analogue à un arrêt d'incompatibilité ; si la fonction d'incompatibilité disparaît, la surinfection et le maintien stable des plasmides qui entrent avec ceux déjà présents est possible.

Cette mutation pourrait être la mutation pcn.

CHAPITRE IX

AGENTS CURANTS

Différents produits chimiques, tels les sels d'acridine, le bromure d'éthidium ou le dodecyl sulfate de sodium (SDS) permettent d'inhiber la réplication du plasmide et "curent" ainsi la bactérie fille du facteur extrachromosomique. Ces composés se nomment "agents curants". La cure peut être réalisée également par un agent physique comme la chaleur et affecte différentes cibles moléculaires biologiques.

A - Cure par intercalage entre les brins d'ADN

a) Les acridines

A certaines concentrations, ces composés s'introduisent entre deux paires de bases adjacentes sur la double hélice d'ADN : la molécule étirée devient plus rigide (50) (4). L'insertion d'une ou plusieurs molécules de proflavine conduit à un mauvais alignement des molécules d'ADN pendant le processus de recombinaison génétique, provoquant ainsi une recombinaison anormale. Le changement induit par la proflavine est donc une conséquence de la recombinaison entraînant la délétion ou l'addition d'une ou plusieurs paires de bases.

(Figure II, p. 58).

b) Le bromure d'éthidium

Ce colorant s'insère entre les paires de bases adjacentes d'acide désoxyribonucléique et entrave le processus de réplication d'une façon analogue à celle des acridines (45). (Figure I, p. 58).

B - Cure par modification du site membranaire d'insertion
(traitement au SDS)

Il semble, selon TONOEDA et coll. (108) que le SDS endommage le site membranaire d'insertion du plasmide. L'utilisation du SDS a d'ailleurs permis d'éclairer les rapports entre le plasmide et la membrane. Le SDS épargnerait le chromosome plus éloigné de la membrane et pourrait provoquer dans un premier temps la perte des pili responsables du transfert du facteur R.

C - Cure par modification des protéines initiatrices

La protéine initiatrice contrôlée par le gène de structure du réplicon peut être modifiée à une certaine température. La réplication est altérée (cf. expérience de thermosensibilité à 42° C).

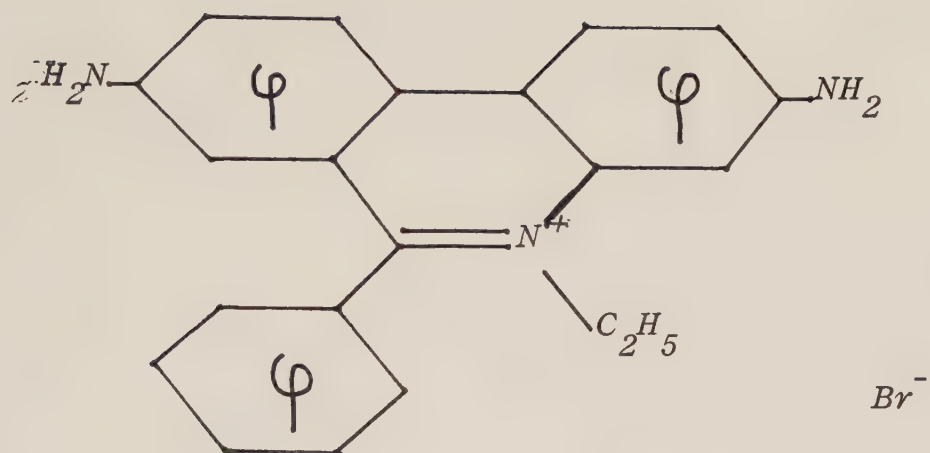


Fig. I : FORMULE DU BROMURE D'ETHIDIUM.

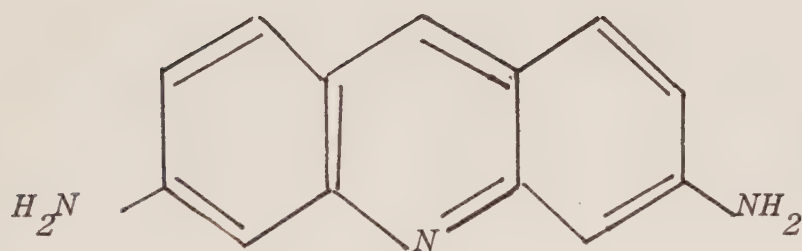


Fig. II : FORMULE DE LA PROFLAVINE

CHAPITRE X

ISOLEMENT des PLASMIDES

PRINCIPES GENERAUX

L'ADN des plasmides se présente naturellement sous forme de double brins, circulaires et surenroulés ("supercoiled").

L'isolement des plasmides pose un double problème : la séparation de l'ADN chromosomique et plasmidique des autres constituants de la bactérie et ensuite l'isolement de l'ADN superenroulé plasmidique, du chromosome.

Différentes méthodes sont utilisées :

A - Le marquage radioactif de l'ADN.

Les marqueurs radioactifs utilisés (45) sont des molécules qui entrent dans la composition des acides nucléiques. Ainsi, l'adénine tritiée est incorporée à la fois dans l'ARN et l'ADN et émet des radiations β ; les phénomènes de radiolyse seront atténués par des lavages soigneux, tandis que la séparation ADN-ARN est réalisée avec des enzymes RNAases lysant l'ARN.

La thymidine tritiée ne s'incorpore que dans l'ADN et a été employée lors de travaux concernant de nombreuses bactéries en particulier, Proteus mirabilis et Escherichia coli.

90 % de l'ADN total est ensuite séparé des autres constituants de la cellule en utilisant des détergents non anioniques.

La thymidine titrée est également employée dans des techniques qui permettent de marquer spécifiquement le plasmide et non l'ADN chromosomique. Dans l'une de ces techniques, (45) on dispose d'un donneur capable d'incorporer la thymidine tritiée et d'un receveur marqué capable de synthétiser de l'ADN; ensuite le plasmide est transféré à un receveur non marqué où il se réplique, l'élément extra-chromosomique est ainsi marqué et devient reconnaissable.

Dans une autre technique (45), les donneurs portant le plasmide, sont alourdis par une croissance en milieu riche ^{13}C et ^{15}N ; ces bactéries sont en outre sensibles aux phages et bien entendu marquées; de leur côté, les cellules receveuses sont moins denses, résistantes aux phages et non marquées. Après le contact, le donneur est lysé grâce aux phages et les cellules réceptrices sont isolées par centrifugation zonale, en fin d'expérience, le seul ADN marqué présent dans le récepteur dérive du plasmide du donneur.

B - L'extraction ou la libération des ADN des autres constituants de la cellule

Ces opérations sont effectuées délicatement afin de ne pas détériorer l'ADN présent dans la cellule. Par exemple, l'utilisation des ultra-sons est proscrite, car le traitement trop drastique scinde les chaînes d'ADN.

Les méthodes employées sont diverses et mettent en jeu un certain nombre de détergents tensioactifs ou d'enzymes.

L'utilisation du Brij 58 (99), détergent non anionique fait sédimenter 90 % de l'ADN chromosomique ; pourtant, quelquefois même additionné de désoxycholate de sodium, il ne permet pas la lyse complète des cellules (95). Il sera fait appel alors à des détergents plus puissants comme le dodecyl sulfate de sodium (SDS) ou le sarcosinate de sodium (48). (Ce dernier ayant l'avantage de ne pas précipiter avec le chlorure de césium employé dans l'ultracentrifugation).

Il est également possible d'employer des tampons contenant du lysozyme (99). Le lysozyme est une enzyme lysosomiale découverte par FLEMING qui hydrolyse les liaisons glycosidiques du peptidoglycane bactérien (spécifiquement les liaisons β 1-4 entre l'acide N acétyl muramique et la N acétylglucosamine). La lyse des protoplastes ainsi produite peut être également réalisée grâce à une solution détergente de N lauryl sarcosine (92).

Dans le cas d'utilisation d'adénine radioactive (92) qui marque ARN et ADN, l'ARN est hydrolysé par une solution de RNAase convenablement préparée afin d'éliminer les traces de DNAase présente dans la solution. (Chauffage de 10 minutes à 80°) (59).

Une autre méthode d'extraction de l'ADN des constituants de la cellule consiste à utiliser des solutions détergentes successives de TRIS et d'EDTA (47) ; la précipitation du DNA

est obtenu par le PEG 6000 qui forme une sorte de réseau entraînant les acides nucléiques à isoler (47).

Enfin, une ultime opération de séparation des protéines peut être réalisée à l'aide d'un mélange chloroforme-octanol (cette dernière manipulation posant quelques problèmes de séparation ultérieure des phases en présence).

C - Isolement du plasmide

Cette séparation est effectuée par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (92). Il se forme dans le tube un gradient de concentration saline de densité croissante de haut en bas(45).

Les molécules d'ADN introduites (plasmide et chromosome) se stabilisent à un niveau où leur densité est égale à celle de la solution. Le contenu du tube est recueilli par fraction et chaque fraction permet l'évaluation des acides nucléiques présents, soit par absorption à 260 nm, soit par comptage de la radioactivité.

Le plus souvent, la composition en bases du chromosome et du plasmide est si voisine (GC % voisin) qu'il s'avère nécessaire d'utiliser un colorant qui s'insère de façon différente entre les paires de bases adjacentes du plasmide et du chromosome. Le colorant, le bromure d'éthidium, se fixe en grande quantité sur le chromosome, tandis que les structures surenroulées (supercoiled) du plasmide empêche quantitativement la même

fixation. Le poids moléculaire de ce colorant étant inférieur au poids moléculaire des bases, la molécule sera d'autant plus allégée que la fixation du colorant sera importante. Cette méthode de RADLOFF (95) utilise la "densité de flottaison" des complexes ADN-colorant.

D - Isolement des plasmides après essais d'enrichissement en ADN extrachromosomique

Ces méthodes permettent d'augmenter la quantité d'ADN plasmidique par rapport à celle d'ADN chromosomique.

1) Méthode du "lysate clair" (48)

Le lysat bactérien, traité comme dans les manipulations de marquage radioactif par exemple, est centrifugé à 48000 g pendant 30 minutes à 2° C ; 90 à 95 % de l'ADN chromosomique est alors précipité, le plasmide restant dans le surnageant (CLEWELL et HELSINKY 1970). Après une déprotéinisation appropriée (chloroforme-octanol), ce surnageant constitue le "lysate clair".

2) Augmentation du nombre de copies de plasmides par cellule

Le rôle de la bactérie-hôte est fondamental et le nombre des copies est fonction, entre autres facteurs, de l'état physiologique de la cellule-hôte (88). En général, si pendant la phase exponentielle de croissance, le pourcentage d'ADN plasmidique est constant, pendant le début de la phase

stationnaire, il augmente considérablement. Les bactéries devront donc être traitées préférentiellement à ce moment, afin de travailler sur une quantité d'ADN plasmidique relative supérieure.

3) Utilisation des Minicells (67)

Les minicells sont de très petites cellules anucléées sphériques de 0,3 à 0,5 μ de diamètre et caractérisées pour la première fois par ADLER (2). Dans un cycle normal de division bactérienne, la synthèse de l'ADN est suivie de la séparation des deux noyaux constitués, le septum se formant entre les deux structures nucléaires, soit immédiatement, soit après un autre cycle de divisions(103).

Mais il peut exister des mutations affectant soit le processus et multiplication cellulaire, soit la synthèse de l'ADN, soit la séparation des deux cellules filles. Ces mutations entraînent alors l'apparition de bactéries, les unes anucléées, les autres multinucléées. Il peut arriver également que la formation du septum et la division cellulaire se fassent normalement et que l'on assiste ensuite à une division additionnelle au pôle de la cellule. Les petites cellules sphériques qui apparaissent sont des minicells. Le processus d'apparition des minicells met en jeu l'invagination simultanée de la paroi et de la membrane qui se produit à la même vitesse que la cellule normale (67). Les minicells s'accumulent pendant la phase logarithmique et persistent pendant la phase stationnaire de croissance ; bien entendu, elles ne se divisent pas et sont produites à 30°, 37° ou 42° C, en milieu liquide ou solide, en milieu simple ou

complexe. Du point de vue chimique, le rapport de l'ARN sur les protéines est identique dans les minicells et dans les cellules normales ; des traces d'ADN ont été néanmoins relevées et sont dues à une contamination par la cellule normale (67).

Les "minicells" permettent l'étude des plasmides ; après un marquage préalable de l'ensemble de l'ADN bactérien, les minicells peuvent contenir de l'ADN exclusivement extra chromosomique.

Pratiquement, les cellules sont isolées à partir de bactéries prélevées en début de phase stationnaire après une centrifugation en gradient de sucrose (45). Cette méthode permet donc de mettre en évidence de l'ADN plasmique sans avoir à le séparer préalablement de chromosome.

LIVRE II

PLASMIDES DE PSEUDOMONAS

CHAPITRE I

PLASMIDES et RESISTANCE aux ANTIBIOTIQUES

*BREF RAPPEL des MECANISMES de RESISTANCE
EXTRACHROMOSOMIQUE aux ANTIBIOTIQUES.*

Les mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques avec leurs supports génétiques respectifs peuvent être résumés dans le tableau suivant :

<i>Mécanisme biochimique</i>	<i>Base génétique</i>
<i>Antibiotique modifié par une enzyme</i>	<i>PLASMIDE (chromosome)</i>
<i>Antibiotique ne pénétrant pas</i>	<i>CHROMOSOME (plasmide)</i>
<i>Cible modifiée ou mutée</i>	<i>CHROMOSOME</i>

Les antibiotiques concernés par ces résistances extrachromosomiques appartiennent à plusieurs familles :

- *groupe des β -lactamines : pénicilline, ampicilline, céphalosporine*
- *groupe des aminosides : streptomycine, spectinomycine, kanamycine, néomycine, gentamicine, tobramycine, sisomycine, amikacine*

- groupe des tétracyclines : tétracycline, minocycline
- chloramphénicol
- synergistine
- sulfamides et association

Les mécanismes de résistance conférés par le facteur R

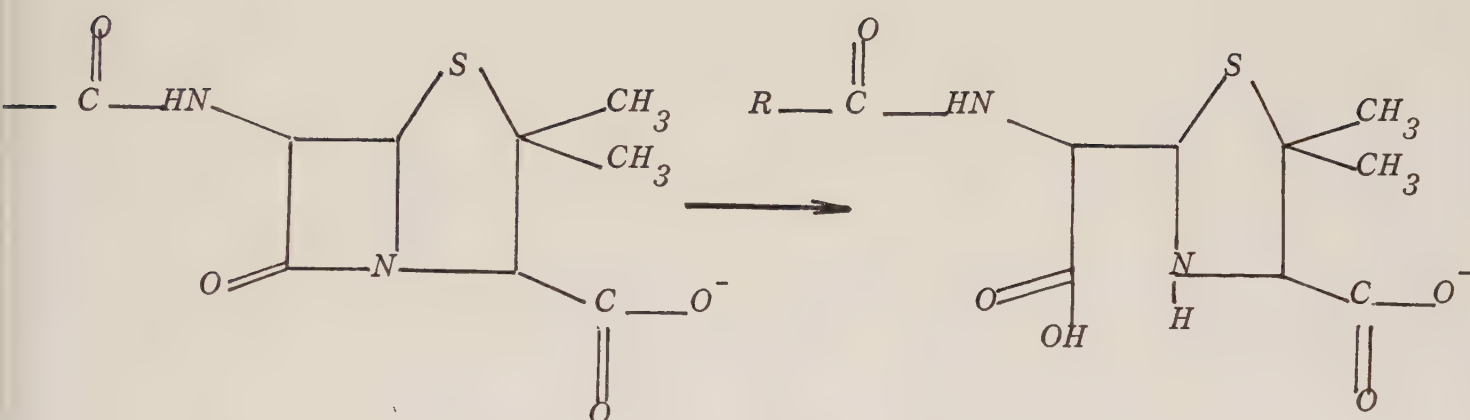
1) Groupe des β -lactamines

Les β -lactamases attaquent la liaison amide du noyau β -lactame des pénicillines et des céphalosporines et font ainsi perdre leur activité antibiotique à ces composés (34) (58, 86, 36).

Lorsque le noyau β -lactame d'une pénicilline est hydrolysé par une B-lactamase, l'acide pénicilloïque correspondant est produit en proportions stoechiométriques (figure p. 71). Cet acide pénicilloïque possède 2 fonctions acides, alors que le composé de départ n'en possédait qu'un. D'autre part, cet acide est stable et peut facilement être détecté. La situation avec les céphalosporines est plus complexe du fait de la présence en position 3 du noyau dihydrothiazine d'un substituant R'. Il semblerait qu'un acide céphalosporoïque serait le premier produit résultant de l'attaque par la β -lactamase. Cet acide est l'analogue de l'acide pénicilloïque, mais à sa différence, il est très instable et ne peut être isolé, car il subit une décomposition rapide (figure p. 72).

La classification des β -lactamases présentes chez les bactéries Gram -est très complexe. On pourrait presque penser que les β -lactamases sont probablement spécifiques du

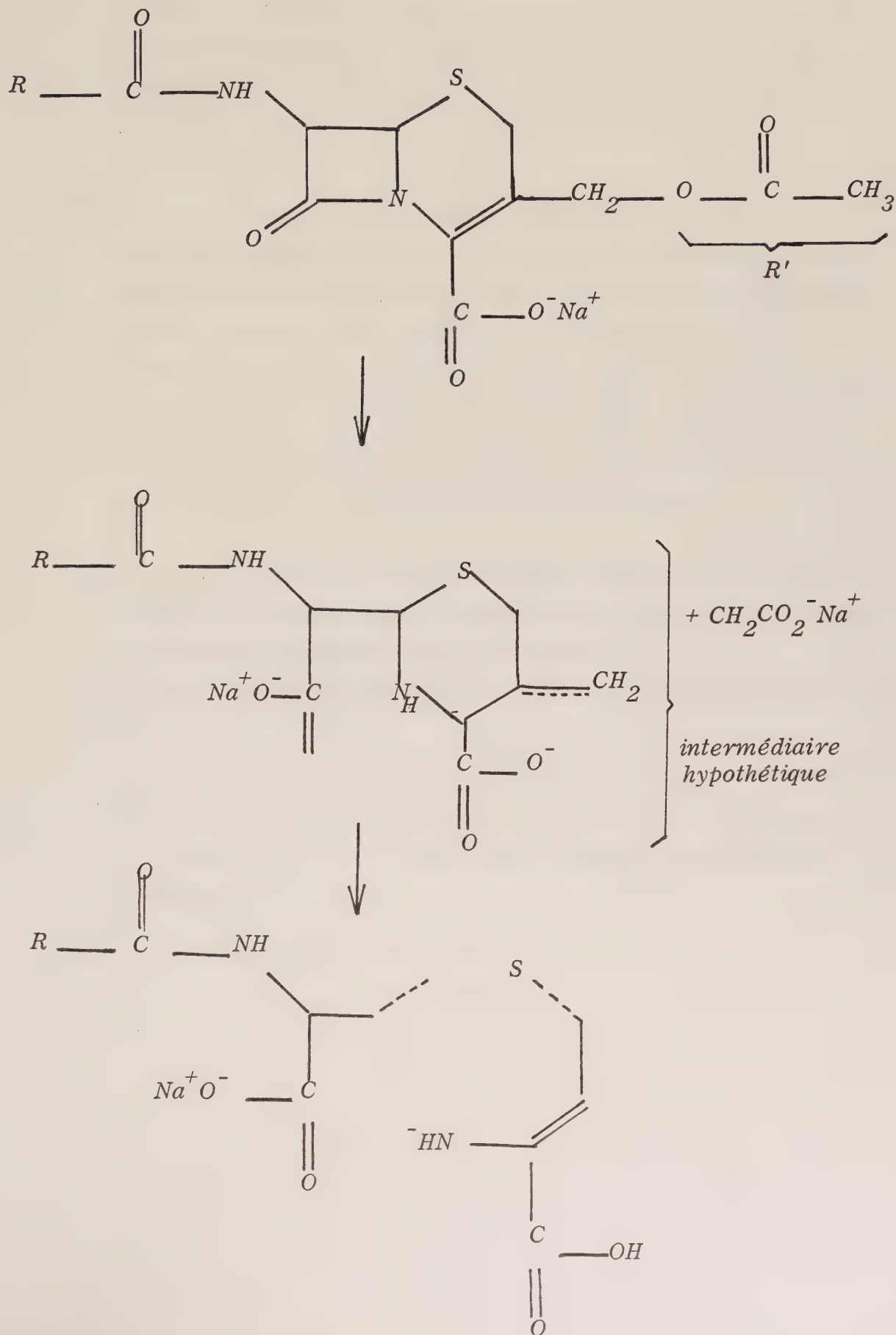
REACTION GENERALE CATALYSEE PAR LES β -LACTAMASES
AYANT DES PENICILLINES POUR SUBSTRATS.



*Structure basique
des Pénicillines.*

*Structure basique
de l'acide pénicilloïque.*

SEQUENCE REACTIONNELLE POSSIBLE DE L'ATTAQUE DES
CEPHALOSPORINES PAR LES β -LACTAMASES.



Fragments.

genre, de l'espèce et même de la sous-espèce ϕ et il s'avère que leur diversité est sans doute aussi grande que celle des bactéries ; de ce fait, une classification formelle n'est pas réaliste (64).

SYKES et MATTHEW (106) ont distingué d'une part les β -lactamases dépendant du chromosome bactérien, d'autre part, les β -lactamases dépendant d'un facteur R transmissible; puis au sein de chaque groupe, une distinction basée sur le profil des substrats a été établie. Ainsi, parmi les enzymes chromosomiques, on distingue les pénicillinases, les céphalosporinases et les enzymes à large spectre, (cela correspond aux classes II, I et IV de RICHMOND et SYKES) (106).

Les enzymes dépendant des facteurs R sont d'abord celles du type TEM à large spectre et ensuite celles qui hydrolysent les β -lactamines à noyau isoxazoloïl. Elles correspondent aux classes III et V de RICHMOND et SYKES.

Il faut souligner que d'autres classifications pourront être envisagées plus tard et que le type d'enzyme plasmidique ne semble pas être lié au groupe de compatibilité du facteur R en cause (58).

Voir tableau page 73.

⁷⁴
B-LACTAMASES PLASMIDIQUES N'HYDROLYSANT PAS LES BETA-LACTAMASES A NOYAU ISOXAZOYL

Type d'enzyme	Pénicilline	Vitesse relative d'hydrolyse de :					Inhibition par la Cloxa-cilline	par le para-chloro-mercure-benzoate	I ou C*	P. M.	pH iso.
		Carbénicilline	Méthicilline	Cloxa-cilline	Céphaloridine	Céphalotine					
TEM-1	100	10	0	0	120	20	S	R	C	22000	5,4
TEM-2	100	10	0	0	120	20	S	R	C	23500	5,6

B-LACTAMASES PLASMIDIQUES HYDROLYSANT LA METHICILLINE ET LES BETA-LACTAMASES A NOYAU ISOXAZOYL

OXA-1	100	-	330	190	30	15	R	R	C	23300	7,4
OXA-2	100	15	20	200	40	25	R	R	C	44600	7,9-7,8
OXA-3	100	-	30	-	45	-	R	R	C	41200	7,0

BETA-LACTAMASES PLASMIDIQUES SELON RICHMOND et SYKES (97)

* I : inducible
C : constitutive

BETA-LACTAMASES de PSEUDOMONAS-AERUGINOSA

- + Enzyme Dalglish
- Enzyme chromosomique
- Enzyme constitutive
- Enzyme de type pénicillinase

- + Enzyme TEM
- Enzyme plasmidique
- Enzyme constitutive

- + Enzyme Sabath-Abraham
- Enzyme chromosomique
- Enzyme inductible
- Enzyme de type céphalosporinase

ENZYMES INACTIVANTS les AMINOSIDES chez PS. AERUGINOSA

- + Kanamycine acétyltransférase 6' I
- + Gentamicine acétyltransférase 3 I
- + Streptomycine phosphotransférase 3''
- + Néo - Kanamycine 3' I phosphotransférase

Type d'enzyme	Vitesse relative d'hydrolyse de :							Inhibition	
	Pénicilline	Carbénicilline	Méthiocilline	Cloxacilline	Cépharidine	Céphalotine	par la Cloxacilline	par le para-chloro-mercuri-benzoate	I ou C* P.M.
TEM-1	100	10	0	0	120	20	S	R	C 22 000
TEM-2	100	10	0	0	120	20	S	R	C 23 500
Enzyme DALGLEISH	100	150	15	<1	40	5	R	R	C 32 000
Enzyme SABATH-ABRAHAM	100	< 5	< 5	< 5	770	50	S	S	I 34 000

BETA-LACTAMASES RETROUVEES CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA SELON
RICHMOND et SYKES (97).

* I : inducible
C : constitutive

2) Groupe des aminosides

Pour la streptomycine par exemple, la mutation chromosomique entraîne d'emblée une résistance à de grande concentration. Cette mutation altère la configuration normale des ribosomes et influe sur la synthèse des protéines. Au contraire, les bactéries résistantes par un facteur R sont résistantes seulement à de basses concentrations de streptomycine.

L'inactivation des Aminosides peut être due à trois types de réactions enzymatiques :

Réactions faisant intervenir

- une adényltransférase
- une phosphotransférase
- ou une acétyltransférase

La spécificité de ces enzymes est cependant différente et il en résulte neuf types de réactions intéressantes, soit un seul aminoside (par exemple : la streptomycine modifiée par l'adényltransférase 3''); soit plusieurs aminosides : lividomycine, néomycine, paromomycine, kanamycine A modifiées par la 3' phosphotransférase I.

3) Groupe des tétracyclines

La nature inductible de la résistance à la tétracycline a été montrée (62), mais son mécanisme est mal connu (modification de la perméabilité). Des travaux de ASHEHOW (1966), BOSTON, KASATIYA et BALDWIN (1967) ont révélé que les gènes responsables de la résistance à la tétracycline étaient portés par

des plasmides dans plusieurs souches de staphylococcus aureus. Le taux d'apparition de variants sensibles à la tétracycline chez des souches de staphylocoques est comparable aux fréquences de pertes de résistance aux pénicillines chez ces mêmes souches. La perte des déterminants de résistance aux tétracyclines est irréversible(94), (98).

4) Groupe du chloramphénicol

Cet antibiotique serait inactivé par une chloramphénicol-acétyltransférase (94). Il existe un fait déterminant : la résistance au chloramphénicol est toujours portée par un facteur R_{fi}^+ .

5) Groupe des sulfamides

Le mécanisme de la résistance aux sulfamides serait une perte de perméabilité vis-à-vis de la drogue et l'arrêt de la pénétration dans la cellule. Il s'agit d'une hypothèse(94).

CHAPITRE II

METHODES DE CLASSIFICATION

1) Classification par l'étude de la compatibilité entre plasmides

Les plasmides ont été classés dans des groupes d'incompatibilité à l'intérieur desquels les membres d'un même groupe ne peuvent coexister de manière stable, les uns avec les autres ; mais ces membres peuvent cohabiter avec un ou plusieurs membres appartenant à d'autres groupes d'incompatibilité(66).

Cette propriété d'incompatibilité se manifeste aussi bien pour le plasmide autonome que pour le plasmide intégré au chromosome de l'hôte (82). Les plasmides ont donc été classés dans plusieurs séries d'incompatibilité (16) ; en effet, les plasmides de Pseudomonas peuvent être transférés à Escherichia coli et inversement les plasmides d'Escherichia coli peuvent être transférés à Pseudomonas. Enfin, pour les plasmides ne pouvant être transférés à Escherichia coli, l'étude d'incompatibilité est réalisée avec des souches ayant déjà des plasmides.

2) Classification par l'étude de l'interaction entre phages et plasmides

Lors de cette interaction, le plasmide peut interférer

selon deux processus (31) :

a) par restriction sur l'ADN étranger. En effet, l'acquisition par une bactérie de certains fragments R peut entraîner la résistance à divers phages. Le phage lambda est l'un de ces phages qui peut être soumis à cet effet de restriction. (107).

b) Par inhibition au niveau de la synthèse de l'ARN. Certains fragments R peuvent inhiber la synthèse de l'ARN messager viral qui au départ est transcrit de l'ADN viral par l'ARN polymérase bactérienne.

Les phages utilisés dans ces études peuvent avoir différentes propriétés.

- transducteurs (phage G 101)*
- lysogénisants (phage D3)*
convertisseurs
- prophages intégrés (phage J 51)*
- prophages extrachromosomiques transducteurs (F116)*
- prophages intégrés défectifs (phage H 90)*

3) Par hybridation

L'étude de l'homologie génétique, par la technique d'hybridation entre des brins provenant de plasmides différents est la technique de classification la plus fine (12). Elle n'a été néanmoins que très peu utilisée pour les plasmides de Pseudomonas. Des travaux de BRYAN (12) ont permis de montrer que les plasmides R 931 et R 130 du groupe P_2 présentent 85 % d'analogie. D'autre part, il semble que les facteurs R du groupe P_1 (comme R P_9) montrent une homologie considérable avec les plasmides du groupe P_2 (60 à 65 %).

CHAPITRE III

CLASSIFICATION DES PLASMIDES

Il existe plus de dix groupes de compatibilité définis par JACOBY (55), (56).

1) Groupe P_1

La plupart des plasmides de ce groupe confèrent la résistance à un certain nombre d'antibiotiques. On a cru très longtemps qu'aucun plasmide de ce groupe ne transférait une résistance à la gentamicine ; cela ne semble plus être vrai (R 527, R 1033).

Certains phages mâles ou femelles reconnaissent les plasmides du groupe P_1 et d'autres non. Cette sensibilité est différentielle ; elle permet également de classer les plasmides.

En résumé, le groupe P_1 peut être défini par les caractères suivants :

a) présence des gènes de transfert pour le passage vers une bactérie receveuse du genre Pseudomonas (aeruginosa et putida) ou vers Escherichia coli. C'est le caractère "Tra⁺".

b) une sensibilité au phage donneur (donor phage susceptible).

C'est le caractère "Dps"

c) la présence d'une interférence dans la propagation du phage $\phi 101$.

C'est le caractère "Phi ($\phi 101$)"

d) une tolérance à la pyocine

C'est le caractère "Pyt"

Le tableau suivant résume les propriétés différentielles de ces plasmides.

(Tableau p. 84).

2) Groupe P_2

Ces plasmides sont transmissibles aux autres espèces de Pseudomonas, mais pas à Escherichia coli. Ils confèrent une résistance à un groupe d'antibiotiques assez large ; un seul plasmide peut conférer la résistance à la carbénicilline et à la gentamicine, deux agents antibactériens importants utilisés dans le traitement des infections à pyocyanique.

Le mécanisme de la résistance à la gentamicine, du aux plasmides pMG_1 et pMG_2 par exemple, est une inactivation de l'antibiotique par production d'une gentamycine acétyl transférase (12). Le plasmide pMG_5 inactive la kanamycine par une kanamycine acétyl transférase.

Comme pour les plasmides P_1 , la structure physique,

GROUPE P_1

Tra^+ Dps Phi (G 101) Pyt

Plasmides	PM $\times 10^6$	GC%	Origine	Propriétés
$RP_1(RP_4^+)$	36		Angleterre	Cb, Kan, Tet
Rm16 b	35		Japon	Cb, Kan, Tet
RP 638			Afrique du sud	Cb, Kan, Tet
R 527	51		Espagne	Cb, Kan, Tet, Chl, Gen, Str, Su, Hg
R 1033			Espagne	Cb, Kan, Tet, Chl, Gen, Str, Su, Hg
RP_4-pMG_2	45		(recombinant)	Cb, Kan, Tet, Gen, Str, Su, Hg
RP_4-pMg_5	57		(recombinant)	Cb, Kan, Tet, Su, Tob, Bor, Hg
RK_2	40			Cb, Kan, Tet Les autres caractères ne sont pas encore précisés
R 702	46			Str, Kan, Tet
R 1033	45			Cb, Gen, Chl

$^+ RP_4$ est maintenant appelé RP_8 HOLLOWAY 1972.

la densité et l'homologie génétique des plasmides P_2 ont été étudiées. Ainsi, le plasmide R_{931} a révélé (par ultracentrifugation et microscopie électronique) deux sortes de CCCDNA :

- l'un dont le poids moléculaire est de 1×10^6 D
- l'autre dont le poids moléculaire est de 25×10^6 D

La densité de flottaison est de $1,718 \text{ g/cm}^3$, ce qui est très proche du RP_1 du groupe P_1 ; mais RP_1 présente un poids moléculaire de 38×10^6 D.

En résumé, le groupe P_2 peut être défini par les caractères suivants :

a) la présence d'un gène de transfert Tra^+ ne permettant le passage du plasmide qu'à l'intérieur du genre Pseudomonas (aeruginosa, fluorescens, putida). La réplication ne serait pas possible dans les Entérobactéries.

C'est le caractère " Tra^+ ".

b) une interférence avec la propagation de phages.

c) une inhibition variable ou non de transfert par conjugaison dépendant de RP_1 .

C'est le caractère " Fi^+ ou $- (RP_1)$ ".

(Tableaux p. 86 et 87).

GROUPE P_2 Tra^+ Fi^+ ou (RPI)

Plasmides	PM	GC%	Origine	Propriétés
pMG_1			Afrique du Sud	$Fi - (RPI)$ Gen, Str, Su, Bor, Hg, Tel, u.v.,
pMG_2			U.S.A.	Gen, Str, Su, Hg, Tel, u.v.,
RPL 11			U.S.A.	Cb, Chl, Gen, Str, Sul, Tet, Bor, Hg, p. Hg, Tel
				$Fi + (RPI)$
pMG_5			Japon	Kan, Sul, Tob, Bor, Hg, Φ Hg, Tel
pMG_6			U.S.A.	Cb, Gen, Kan, Str, Sul, Tet, Chr, Hg, Tel
Rm 16 a			Japon	Cb, Chl, Gen, Kan, Str, Tob, Bor, Hg, Tel
R 38			Japon	Str, Sul, Tet, Bor, Hg, Φ Hg, Tel
kR 61			Japon	Chl, Str, Su, Tet, Bor, Hg, Φ Hg, Tel
Rms 159			Japon	Chl, Str, Tet, Bor, Hg, Φ Hg, Tel
R 931	1 à 25	58	Canada	Str, Tet, Hg, Tel, u.v.,
R 3108			Canada	Str, Su, Tet, Bor, Hg, Φ Hg, Tel
CAM				cam, Tel, u.v.,
R 130 (+)	23			Str, Su, Gen
OCT (++)				alc, Tra^-
R 130 (+++)				Les autres caractères ne sont pas encore précisés

(+) d'après Chakrabarty

(++) d'après Fennewald

(++) d'après Bryan 1974.

P_2 suite

	<i>PM</i>	<i>GC%</i>	<i>Origine</i>	<i>d'après FENNEWALD</i>
<i>pMF 581</i>				<i>Alc, Cam, Tetra, Strepto, Hg, u.v., Tra⁺</i>
<i>pMF 583</i>				<i>Alc, Strepto, Tetra, u.v., Tra⁺</i>
<i>pMF 585</i>				<i>Alc, Cam, Tetra, Strepto, Sul, Hg, Tra⁺</i>
<i>pMF 724</i>				<i>Alc, Tetra, Tra⁻</i>
<i>pSB 725</i>				<i>Alc, Strepto, Tet, Hg, Tra⁺</i>
<i>pSB 729</i>				<i>Alc, Tet, Strepto, Su, Hg, Tra⁺</i>
<i>pMF 582</i>				<i>Alc, Tet, Tra⁻</i>

3) Groupe P_3

Les plasmides du groupe P_3 constituent le groupe C chez Eschrichia coli et sont transmissibles à Pseudomonas et à Escherichia coli. Comme les plasmides P_1 et P_2 , ils confèrent une résistance à un certain nombre d'antibiotiques ainsi qu'à la gentamicine.

(tableau page 89)

4) Groupe P_4

(tableau p. 90)

5) Groupe P_5

(tableau page 90)

6) Groupe P_6

(tableau page 90)

7) Groupe P_7

(tableau page 90)

8) Groupe P_8

(tableau page 90)

9) Groupe P_9

(tableau page 90)

10) Groupe non encore précisé (tableau p. 91)

Ce groupe de plasmide est caractérisé comme ne donnant aucune inhibition de transfert par conjugaison dépendant de RP_1 .

GROUPE P_3

<i>Plasmides</i>	<i>PM x 10⁶</i>	<i>GC%</i>	<i>Origine</i>	<i>Propriétés</i>
<i>pMG₇</i>	30		<i>Islande</i>	<i>Genta, Mana, Sul, Tob, Hg, Tra⁻, Phi, Fi⁺</i> <i>(RP₁)</i>
<i>Rip64</i>	65		<i>France</i>	<i>Cb, Chl, Genta, Sul, Tob, Hg, Tra⁺, Fi⁺</i> <i>(RP₁</i> <i>FP₂)</i>
<i>R151</i>			<i>U. S. A.</i>	<i>Cb, Genta, Strepto, Sul, Tob, Tra⁺, Fi⁻</i> <i>(RP₁), Fi⁺, (FP₂)</i>
<i>d'après CHAKRABARTY</i>				
<i>R64</i>				<i>Cb, Genta, Strepto, Tetra</i>
<i>R 55</i>				<i>Amp, Cloram, Su, Kana, Strepto.</i>

GROUPE P_4

<i>Plasmides</i>	$PM \times 10^6$	GC	<i>Origine</i>	<i>Propriétés</i>
<i>R 679</i>	5 à 6		<i>Canada</i>	<i>Strepto, Sul, Tra⁻, Fi⁺ (RPi)</i>
<i>R 1162</i>	5 à 6		<i>Canada</i>	<i>Strepto, Sul, Tra⁻, Fi⁺ (RPi)</i>
<i>R 5265</i>	5 à 6	58	<i>Canada</i>	<i>Strepto, Sul, Tra⁻, Fi⁺ (RPi)</i>
<i>Rms 163</i>			P_5 <i>Japon</i>	<i>Cb, Su, Tet, Bor, Tra⁺, Fi⁻ (RPi)</i>
<i>Rms 149</i>	36		P_6 <i>RFA</i>	<i>Cb, Genta, Strepto, Sul, Tra⁺ Phi (F₁₁₆) Fi⁻ (RP₂)</i>
<i>Rms 148</i>			P_7 <i>RFA</i>	<i>Strepto, Tra⁺, Phi (B₉₉C₅) Fi⁻ (RP₁) Fi⁺ (RP₂)</i>
FP_2			P_8 <i>Australie</i>	<i>Hg, Hg, Tra⁺, Fi⁻ (RP₁)</i>
R_2	40		P_9 <i>Japon</i>	<i>Cb, Strepto, Sul, u.v., Tra⁺ Fi⁺ (RP₁ Fp2)</i>
<i>SAL</i>	30-52			<i>Sal, Tra⁻, Fi⁺ (RPi), Fi⁻ (Fp2)</i>

GROUPE NON DETERMINE

	$PM \times 10^6$		Tra^+
RP_{1-1}	34	Angleterre	$Cb, Phi (B_{39})$
RP_8	36	Ecosse	Cb
R_{40c}	36	France	Cb
R_{503}		Canada	$Strepto, Hg, Phi (B_{39})$
R_{716}		Canada	$Strepto, Hg, Phi (B_{39})$
FP_5		Japon	Hg
R_{91}	35	Angleterre	$Cb, Fi^+ (FP2)$
			Tra^-
Tol			Xyl
<i>Divers</i>			
Hg	19		Su, Hg, Tra^-
pMG_{13}	50	Irlande	$Hg, u.v., Tra^+$
pMG_{16}	30	Canada	(cryptic)
$56 Be$		France	Cb

TABLE 5. *R* plasmids not transmissible to *P. aeruginosa*^a

R plasmid	Incompatibility group	
	Chabbert et al.	Datta, Hedges, et al.
R386		FI
R1, R1-16, R1-19		FI1
R124		FIIV
R64, R64-11	Com 1	I _α
R483		I _β
R621a		I _γ
JR66a		I _ω
N3, R15	Com 2	N
R16a	Com 6	C
R69, R446b, R135	Com 7	M
R111i, R6K	Com 8	X
R71a	Com 9	
R391		J
Rts1, R402		T
RA1		A
R387		K

^a *E. coli* donor strains were provided by Y. A. Chabbert (6), N. Datta (11, 12), and E. Meynell (18). *Pseudomonas* recipients included PU21, PA0303 (21) and PAT904 (25). Selection for R-plasmid transfer was made after overnight mating on minimal antibiotic plates supplemented with the amino acids required by the recipients but lacking those required by the donor.

PLASMIDES DE RESISTANCE NON TRANSMISSIBLES A PSEUDOMONAS AERUGINOSA SELON JACOBY (55)

TABLE 6. *R* plasmids transmissible to *P. aeruginosa*^a

R plasmid	Incompatibility group		Strain of origin
	Chabbert et al.	Datta, Hedges, et al.	
R46 (Cb Sm Su Tc)	Com 2	N	<i>Salmonella typhimurium</i>
R-a (Cm Km Sm Su)	Com 3	W	<i>Shigella</i> species
R7K (Cb Sm)	Com 3	W	<i>Proteus rettgeri</i>
R388 (Su)	Com 3	W	<i>Escherichia coli</i>
R P1 (Cb Km Tc)	Com 4	P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
R40a (Cb Km Su)	Com 6	C	<i>P. aeruginosa</i>
R55 (Cb Cm Km Gm Su)	Com 6	C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
R64 (Cb Cm Km Gm Su)	Com 6	C	<i>P. aeruginosa</i>

^a footnote to Table 5. Abbreviations: Cb, Carbenicillin; Sm, streptomycin; Su, sulfonamide; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Gm, gentamicin complex.

PLASMIDES DE RESISTANCE TRANSMISSIBLES A PSEUDOMONAS AERUGINOSA SELON JACOBY (55)

C'est le caractère " Fi^- (RP_1)"

(tableau p. 91)

11) Plasmides d'autres groupes (W et N) dont l'hôte naturel n'est pas manifestement *Pseudomonas aeruginosa*

Les plasmides des groupes W et N n'apparaissent pas naturellement en *Pseudomonas* (16) bien qu'ils puissent y être transférés depuis d'autres espèces. Ainsi, le plasmide S-a du groupe W peut être transféré de *Shigella* à *Pseudomonas* et confère une résistance élevée à la kanamycine, gentamicine, tobramycine, streptomycine et aux sulfamides.

Dans le groupe N, on trouve en particulier les plasmides R_{113} et R_{46} responsables de résistance aux tétracyclines.

L I V R E I I I

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I

MATERIEL

MATERIEL

I - Méthode par marquage du matériel génétique à l'adénine tritiée

1) Souches utilisées

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* utilisées sont les suivantes :

PAO16.70 ade-136 leu-8 chl-3 rif 1 (77)
HL souche sauvage (73)

2) Matériel

. Milieu minimum (M.M.)	$PO_4^{HK}_2$	_____	7 g
	$PO_4^{H_2K}$	_____	3 g
	$(SO_4^{Mg}) 7H_2O$	_____	0,25 g
	$SO_4 (NH_4)_2$	_____	1 g
	citrate trisodique	_____	0,5 g
	H_2O q. s. p		500 ml

Le pH est égal à 7,0 et la solution est stérilisée par filtration.

. Milieu minimum additionné de glucose, adénine et leucine. (Pour marquage de l'adénine).

M.M. + glucose à 5 pour mille
adénine à 5 mcg/ml
leucine à 20 mcg/ml

. Adénine tritiée. Cette molécule radioactive est préparée par le C.E.A. France (Service des molécules marquées) et se présente sous forme d'une solution aqueuse stérile de 0,5 ml contenant 2 % d'éthanol. L'activité totale est de 1mCi ; l'activité spécifique de 15 Ci/mM. L'adénine tritiée émet des radiations β molles dans un rayon de 0,5 mm. La période du tritium est de 12,37 ans. (Voir courbe d'activité page 97).

. Matériel de centrifugation

- Tubes à centrifuger de 20 ml préalablement stérilisés aux U. V. Centrifugeuse M.S.E.

- Tubes à ultracentrifuger de 9 ml en ultracentrifugeuse BECKMANN L 550, rotor SW 501.

. Tampon SET

- Tris base "Sigma" (tris hydroxyméthyl amino méthane) à 0,05 M

- NaCl à 0,015 M

- E.D.T.A. à 0,1 M

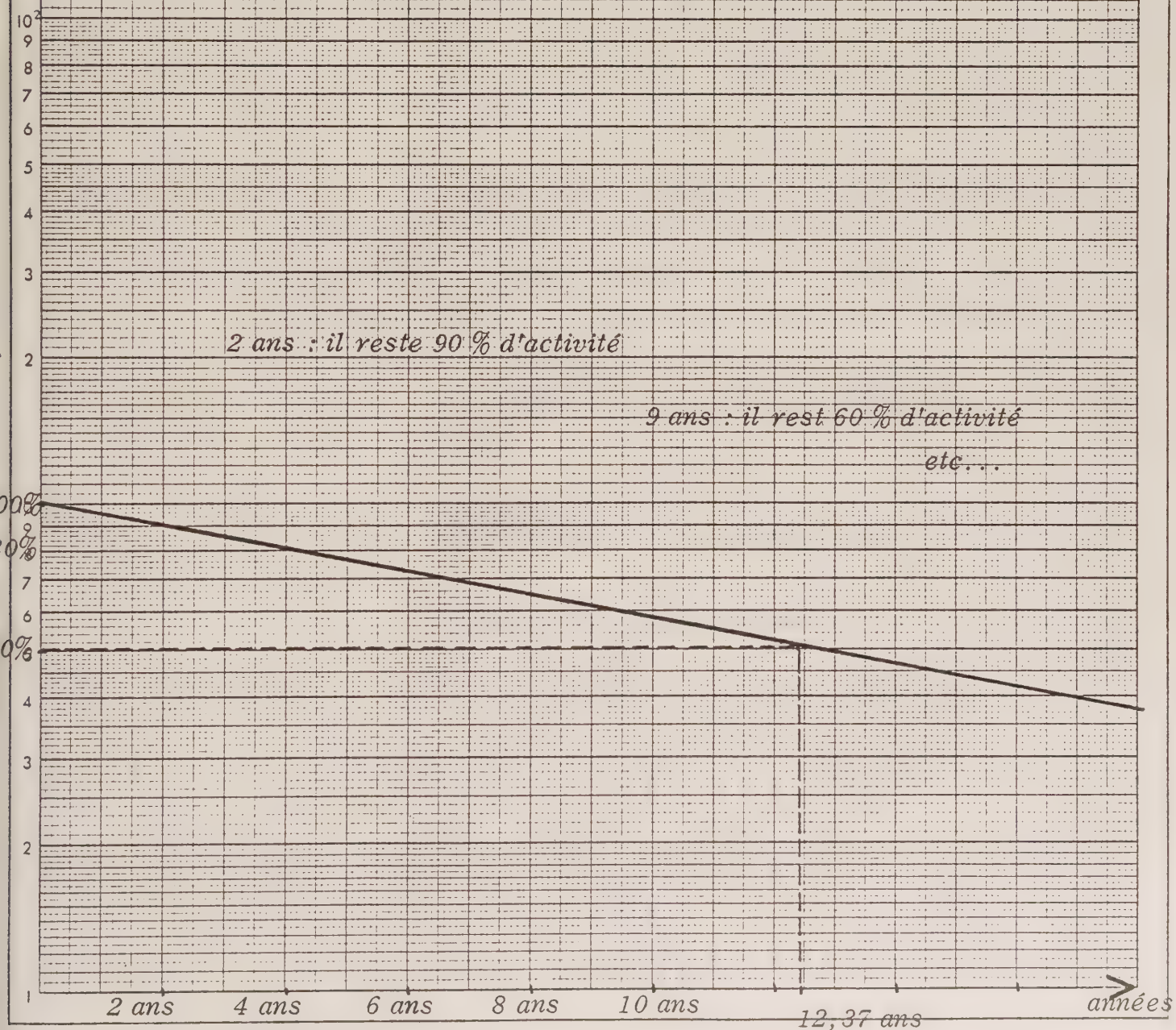
Le pH de la solution aqueuse est égal à 8.

COURBE D'ACTIVITE D'UNE MOLECULE MARQUEE AU TRITIUM EN FONCTION DE SA PERIODE (DEMI-VIE)

Période du Tritium : 12,37 ans

Energie : 18,6 Ke.v.

L'Adénine tritiée émet des radiations bêta molles dans un rayon de 0,5 mm.



. Tampon SET contenant lysozyme, RNAase et
N lauryl sarcosine

SET + lysozyme (muramidase "sigma" à 2 mg/ml
+ RNAase ("sigma") à 500 mcg/ml
+ N laurylsarcosine ("sigma") à 4 % (P/V)

. Tampon S.S.C.

NaCl _____ 0,876 g
citrate disodique _____ 0,441 g

H_2O q.s.p. = 100 ml

Le pH de ce tampon est égal à 7,0.

. Tampon phosphate à 0,1 M. pH = 7,1

Solution A : PO_4H_2K = 13,609 g pour 1000 ml H_2O

Solution B : PO_4HK_2 = 17,42 g pour 1000 ml H_2O

et mélange 39,2 ml de solution A et 60,8 ml de solution B.

. Solution d'EtBr dans tampon phosphate

EtBr = 28 mg

tampon phosphate = 20 ml

(voir formule du bromure d'éthidium page

. Chlorure de césium MERK

. Solutions aqueuses de NaOH et HCl à 2 N.

. Acide trichloracétique à 25 % et à 10 %

. Acide acétique à 1 %

- . ARN levure (torula) "sigma"
- . Huile de parafine stérile
- . Réfractomètre
- . Filtre "millipore" 0,22 μ
- . Fiole à scintillation de 20 ml PACKARD
- . Mélange scintillant :
 - 1-4. bis 2(4 méthyl, 5 phényl oxazolyle) benzène (POPOP)
= 75 mg
 - 2,5 diphényl oxazole (P.P.O.) = 5 g
 - Toluène q. s. p.
- . Appareil de comptage (PACKARD Tri Carb)

II - Méthode de HUMPHREYS et coll. (47)

1) Souches utilisées :

Pseudomonas aeruginosa PAO8 (56)

met-28 ilv-202 str-1 (79)

2) Matériel : milieu coeur-cerveille (BD)

- . pots à centrifuger de 250 ml
- . tampon phosphate pH : 7,1
- . tampon Tris base à 0,05 M
- . solution saturée d'EDTA
- . NaCl
- . P.E.G. 6000 (polyéthylène glycol de P.M.
= 6000)
(Union carbide UK limited)
- . tampon S.S.C.
- . bromure d'éthidium "Sigma"

- . mélange chloroforme à 2 % d'octanol (PRO-LABO),
- . trocart ponction lombaire
- . matériel de réfractométrie et d'ultracentrifugation identique

III - Matériel de dialyse

- . mélange biphasique d'isopropanol et d'une solution aq. saturée de chlorure de césium
- . solution de Tris base à 0,01 M et d'E.D.T.A. à 0,01 M.
- . membranes de dialyse (union carbide corporation)"

Les membranes sont préalablement traitées dans une solution d'E.D.T.A. portée à ébullition pendant 5 minutes.

IV - Matériel pour l'essai de marquage spécifique du plasmide

1) Souches utilisées :

souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO8

souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1670 (56)

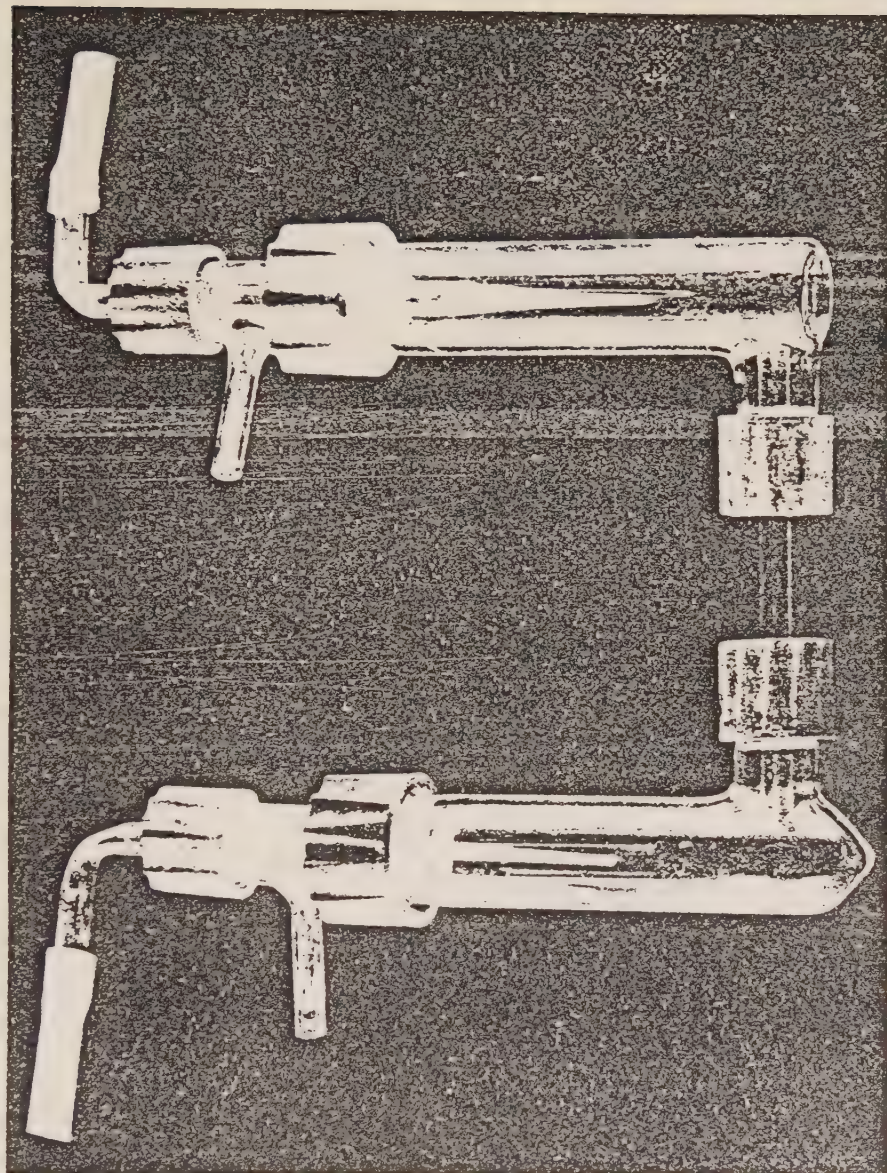
2) Matériel

- . appareillage (voir photographie page 101)
(le fond conique du cylindre A devait permettre la sédimentation des bactéries tuées)
- . source d'air (compresseur) et d'azote
- . centrifugeuse M.S.E. + pots à centrifuger
- . milieu minimum glucose + adénine + leucine

APPAREILLAGE POUR L'ESSAI DE MARQUAGE SPECIFIQUE DU PLASMIDE

Air (compresseur)

Azote



Cylindre A

Cylindre B

tube capillaire

M.M + glucose à 5‰
+ adénine à 20 mcg/ml
+ leucine à 20 mcg/ml
. milieu minimum glucose + méthionine + isoleucine

M.M. + glucose à 5‰
+ méthionine à 20 mcg/ml
+ isoleucine à 20 mcg/ml

. milieu sélecteur

milieu Müller-Hinton + carbénicilline à 500 mcg/ml
+ streptomycine à 1000 mcg/ml

. milieu M.H.

. milieu M.H. + carbénicilline (2000 mcg/ml)
+ streptomycine (1500 mcg/ml)

V - Matériel pour la microscopie électronique

- . formwar (BALZERS) à 0,3 % dans dichloro-éthane (MERK)*
- . lame de verre*
- . teepol*
- . cylindre à décanter*
- . eau bidistillée*
- . grilles pour microscopie électronique BALZERS*
- . Parafilm*
- . Spectrophotomètre BECKMANN*
- . Tampon S.S.C.*
- . Cytochrome c "Sigma"*

- . *Acétate d'ammonium MERCK*
- . *Fil de platine pour évaporation BALZERS*
- . *Acétate d'uranyle MERCK*
- . *Evaporateur SIEMENS*
- . *Microscope électronique SIEMENS EL 101*

CHAPITRE II

METHODES

I - METHODE par MARQUAGE du MATERIEL GENETIQUE à l'ADENINE TRITIEE

Nous avons eu recours à la technique dérivée des travaux de RADLOFF et coll. (95). Cette méthode est basée sur la différence de comportement de "flottaison" de l'ADN plasmidique et chromosomique en solution de chlorure de césium (Cscl) et de bromure d'éthidium (Et Br).

La première étape consiste à faire incorporer une base purique radioactive à l'ADN bactérien pour pouvoir ensuite repérer la position des différents complexes ADN-bromure d'éthidium après ultracentrifugation isopycnique en gradient de densité.

1) Marquage de l'ADN

Ce marquage aurait été plus facile si nous avions pu disposer de souches thymidine⁺, mais actuellement, nous n'utilisons que les souches adénine⁻. La souche utilisée est résistante à la carbénicilline par suite de la présence du plasmide 56 Be et exigeante en adénine, si bien qu'il est possible de lui faire incorporer pendant la croissance de l'adénine radioactive (tritiée) qui se retrouvera aussi bien dans l'ADN que l'ARN bactérien. Les bactéries sont cultivées en 1/2 minimum additionnées de glucose,

d'adénine et de leucine. Puis, les cultures sont diluées dans le même milieu neuf, afin d'obtenir une densité optique à 650 nm égale à 0,05 (ce qui correspond environ à 5.10^7 bactéries/ml). Cette nouvelle culture est divisée en deux subcultures :

- l'une (A) de 10 ml est destinée au marquage
- l'autre (B) permettra de suivre la croissance bactérienne

La subculture A reçoit l'adénine tritiée (C.E.A.). Les bactéries se développent pendant 3 générations, c'est-à-dire jusqu'au moment où la densité optique à 650 nm atteint 0,4.

2) Préparation et lyse des protoplastes

La culture additionnée d'adénine tritiée est centrifugée pendant 15 minutes à 4° C dans des tubes préalablement stérilisés aux U. V.

Le culot est repris pour être lavé dans du tampon S.E.T. . Ce lavage éliminera entre autres le tritium libre qui pourrait, par un phénomène de radiolyse, endommager les molécules d'adénine. Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est remis en suspension dans du tampon SET contenant du N lauryl sarcosine. On laisse incuber 30 minutes à 37°.

Note : la solution de RNA est préalablement chauffée pour éliminer les traces de DNAase.

La solution est ensuite homogénéisée grâce à une

seringue à intra dermoréaction. L'apparition à la sortie de la seringue d'une substance de consistance visqueuse semble être le signe de la présence d'ADN et donc de la réussite de la lyse des protoplastes, grâce aux détergents.

3) Ultracentrifugation

Le lysat bactérien est additionné du tampon SSC, du bromure d'éthidium en solution dans un tampon phosphate et du chlorure de césium. Le bromure d'éthidium est à concentration de 1,4 mg/ml dans le tampon phosphate.

La quantité de chlorure de césium utilisée a été choisie de façon que la densité finale de la solution ultracentrifugée soit voisine de $1,700 \text{ g.cm}^3$; les travaux de M. JOUVENOT montrent que cette densité est souhaitable pour que les pics d'ADN soient placés convenablement dans le tube de gradient. (57).

Le chlorure de césium est ajouté jusqu'à la densité voulue. Il existe une relation entre la densité et l'indice de réfraction de la solution de chlorure ; la densité recherchée correspondant à un indice de 1,395, l'utilisation du réfractomètre permet l'ajustement exact de la solution.

Les tubes sont alors complétés avec de l'huile de parafine stérile et placés dans un rotor SW.50.1 et centrifugés à 44000 tours/mn dans une ultracentrifugeuse Beckmann L.5.50 à 19° C.

4) Isolement de l'ADN après hydrolyse de l'ARN

A l'issue de l'ultracentrifugation, le gradient est fractionné par perforation du tube à la base et recueilli par fractions de quelques gouttes chacune.

Une partie de chacune de ces fractions est placée dans un tube à hémolyse et additionnée de soude à 2 M, afin d'hydrolyser l'ARN. L'incubation dure 24 heures à 37 °C.

L'acide chlorhydrique à 2N permet de neutraliser ensuite la solution qui est placée à 4°C pendant une heure. Est ajouté ensuite de l'ARN de levure (*torula*) par tube. Après trente minutes à 4°, on ajoute de l'acide trichloracétique à 25 % par tube et la solution est remise trente minutes à 4° C avant de récupérer l'ADN ainsi précipité sur un filtre millipore. Les filtres sont ensuite lavés une autre fois de l'acide trichloracétique à 10 % et de l'acide acétique à 1 %, avant d'être placés pendant une nuit à l'étuve à 37° C pour être séchés.

Chaque filtre, placé dans des fioles à scintillation, reçoit 10 ml d'un mélange scintillant. Le comptage de la radio-activité permet de localiser les différents ADN.

II - UNE TECHNIQUE de HUMPHREYS, WILLSHAW et ANDERSON (47) utilisant le PEG 6000.

1) Lyse des protoplastes

Après vérification de l'identité de la souche à étudier, un litre de milieu de culture riche (coeur-cervelle) est mis à

incuber. Au terme de l'incubation, au début de la phase stationnaire, le milieu est éliminé par centrifugation dans des pots de 250 ml à 10 000 tours par minute à 4° C pendant 25 minutes. Le culot bactérien est ensuite lavé dans du tampon phosphate à 0,1 M.

Après une seconde centrifugation identique, le culot est repris par 70 ml de tampon Tris base à 0,05 M. La lyse est effectuée par une solution saturée d'E.D.T.A. et se poursuit à 4° pendant 12 à 24 heures. La lyse est en général visible et se traduit par un éclaircissement du milieu. Cette opération se fait sous agitation lente.

La force ionique du milieu est ensuite ajustée par du chlorure de sodium. La précipitation de l'ADN est obtenue par l'adjonction de 10 g de PEG 6000. (10 % P/V) et cette opération est poursuivie pendant 4 heures jusqu'à 12 heures à 4° C.

Le surnageant est éliminé à la propipette après une centrifugation de 10 minutes à 2000 tours/mn et le culot est redissout dans 8 ml de tampon SSC et centrifugé quelques minutes à 2000 t/mn. L'ADN se trouve dans le surnageant que l'on recueille.

2) Ultracentrifugation

La séparation des ADN est réalisée par une ultracentrifugation isopycnique en chlorure de césium selon les conditions décrites précédemment. La quantité de bromure

d'éthidium utilisé est de 500 mcg/ml de solution centrifugée. Certains préconisent une déprotéinisation préalable à l'aide d'un mélange chloroforme et octanol à 2 % ; toutefois, nous avons abandonné cette étape qui provoquait la formation d'une sorte de solution micellaire qui interdit le retrait du solvant organique ;

Les disques d'ADN plasmidique et chromosomique sont prélevés avec une seringue à aiguille longue (trocart à ponction lombaire). Toutefois, ce prélèvement est rendu difficile par une calotte compacte de protéines et de débris cellulaires située au-dessus des disques d'acides nucléiques. Cet inconvénient peut être évité par une ultracentrifugation courte préalable qui permet l'élimination de la calotte déjà formée.

3) Modification de la méthode

Une modification peut être apportée à cette manipulation: la lyse est obtenue par addition au culot initial de la solution suivante:

*50 ml de Tris à 0,05 M
25 ml d'EDTA à 0,25 M
additionné de lysozyme*

Après la clarification du milieu observé, les débris cellulaires et une certaine partie de l'ADN chromosomique sont précipités par la solution suivante :

*10 ml de Triton 100 à 2 % dans du Tris
à 0,05 M et E.D.T.A. à 0,0625 M.*

Les débris cellulaires et l'ADN forment, après centrifugation à 10 000 t/mn pendant 40 mn à 4° C un culot compact. Le surnageant est récupéré et traité comme précédemment avec le P.E.G. 6000.

4) Traitement du matériel plasmidique

Le disque contenant le plasmide est prélevé dans le tube et cette solution doit être débarrassée du bromure d'éthidium et du chlorure de césium.

L'extraction du bromure d'éthidium est réalisée avec de l'isopropanol préalablement mis en contact avec une solution saturée de chlorure de césium. La fraction contenant l'ADN plasmidique est additionnée d'une quantité égale de solvant organique qui extrait le bromure d'éthidium.

Pour éliminer le chlorure de césium, on procède par une dialyse contre un litre de solution contenant du Tris et de l'E.D.T.A.. L'opération est effectuée sous agitation à 4° C pendant 24 à 48 heures, en changeant la solution de dialyse.

Enfin, le matériel plasmidique est stocké à 4° C à l'abri de la lumière.

5) Etude en microscopie électronique

La méthode utilisée est celle de KLEINSCHMIDT (60) (1968) et de LANG, MITANI, 1970 (63).

A - Préparation des grilles

Deux types de supports sur grilles peuvent être utilisés :

a) Support de formwar seul. Le formwar est utilisé à 0,3 % dans le dichloréthane. Une lame de verre de 7 cm sur 3 cm est lavée avec du teepol, essuyée à l'aide de papier "optique" et enfin trempée dans la solution de formwar. L'opération s'effectue dans un cylindre à décanter. Le formwar s'écoule par le bas et après avoir séparé les deux couches de formwar par grattage du bord de la lame, celle-ci est descendue verticalement et assez lentement au-dessus d'une cuve d'eau bidistillée, ce qui permet le décollement et la flottaison des deux couches de formwar sur l'eau.

Les grilles sont alors déposées sur la pellicule mince et le tout est récupéré à l'aide d'un rectangle de Parafilm.

b) Support formwar et carbone

Sur les grilles recouvertes de la pellicule de formwar est déposée une fine pellicule de carbone par la technique d'évaporation sous vide. Cette technique permet de renforcer la résistance des grilles au bombardement électronique.

Il existe d'autres méthodes de préparation des grilles (support collodion, support carbone seul).

B - Préparation du dépôt de l'échantillon

L'échantillon d'ADN stocké à 4° est réchauffé à la

température ambiante. Une étude d'absorption à 260 nm permet d'évaluer approximativement la concentration d'ADN dans la solution. Une densité optique de 1 correspond sensiblement à 50 mcg d'ADN par ml (43).

Il est nécessaire de ne pas partir d'une solution trop concentrée d'ADN. La concentration qui correspond à 0,1-0,2 de d. o. est satisfaisante. Sinon l'échantillon sera dilué dans du tampon S.S.C.

L'ADN est mélangé à une solution de cytochrome c et d'acétate d'ammonium. Ce mélange est déposé par goutte de 50 μ l sur du Parafilm ou une plaque de Téflon. Ces gouttes sont laissées au repos une dizaine de minutes, protégées par le couvercle d'une boîte de Pétri, afin de la préserver de la poussière.

La grille, saisie par une pince fine est mise en contact un instant avec une goutte du mélange ADN-cytochrome c acétate d'ammonium. Elle est enfin séchée avec du papier filtre.

C - Technique de l'ombrage

Les grilles sont exposées sous un angle de 20° à un faisceau d'atomes de platine évaporés par un chauffage intense sous un vide puissant. Le procédé permet une excellente définition de l'image.

Il existe en outre une autre technique de visualisation au microscope électronique que nous avons également employée.

Il s'agit d'une coloration négative pratiquée à l'aide de sels relativement instables de métaux lourds (60). L'acétate d'uranyle est utilisé en solution à 2 % dans de l'eau distillée : la solution est ensuite filtrée, avant utilisation.

D - Observation

Voir chapitre "RESULTATS", page 130.

III - ESSAI de MARQUAGE SPECIFIQUE du PLASMIDE

Le but de la manipulation est de marquer par un isotope radioactif l'ensemble de l'ADN chromosomique et plasmidique d'une souche (PAO 16.70 (56)), d'effectuer ensuite, une conjugaison avec une souche receveuse PAO 8 qui ne doit recevoir que de l'ADN plasmidique marqué. Enfin, la souche receveuse conjuguée sera isolée afin d'obtenir dans ces conditions un marquage exclusif de l'ADN plasmidique.

1) Principe

Il repose sur la possibilité d'obtenir des conjugués dans un milieu pauvre (milieu minimum glucose) et ensuite de détruire la bactérie donneuse tout en permettant à la bactérie PAO 8 conjuguée de se déplacer vers un milieu qui lui est métaboliquement plus favorable que le milieu de conjugaison.

2) Appareillage

Il comprend (voir photographie page 101) un cylindre A contenant du milieu minimum glucose et relié par un capillaire à un cylindre B contenant un milieu contenant des acides aminés. Le cylindre A est sous atmosphère d'azote, le cylindre B sous atmosphère d'oxygène.

Le cylindre A ne permet pas la croissance, ni du donneur ni du receveur, mais est favorable à la conjugaison du PAO 1670 (56) (ADN marqué) ; l'adjonction dans le cylindre A d'un mélange antibiotique permet la destruction de la souche PAO 1670 (56) mais laisse toute sa vitalité à la souche receveuse afin de sélectionner les bactéries PAO 8 (56) ayant uniquement leurs plasmides marqués. Lesquelles, par un phénomène de chimio-tactisme pourront migrer vers le cylindre B plus favorable métaboliquement.

3) Expérimentation

Dans un premier temps, nous avons déterminé si la conjugaison entre PAO 1670 (56) et PAO 8 était possible dans un milieu pauvre et quel était le temps de contact nécessaire pour obtenir les conjugués.

Chaque souche a été cultivée dans des milieux favorables :
PAO 12.56 dans un milieu minimum additionné de glucose, d'adénine et de leucine
PAO 8 dans un milieu minimum additionné de glucose, de méthionine, d'isoleucine et de valine.

Ces souches sont centrifugées pendant la phase exponentielle (10000 RPM pendant 15 mn) et remis en suspension dans le milieu pauvre à raison d'une partie de donneur pour cinq parties de receveur. Le volume total de conjugaison correspondant à 4,5 ml.

Des prélèvements sont effectués 30, 60 et 90 minutes après la mise en contact et 0,1 ml à différentes dilutions est isolé sur un milieu sélecteur contenant de la carbénicilline et de la streptomycine. Dès la trentième minute, des conjugués sont obtenus à la fréquence de 10^{-4} à 10^{-5} .

La conjugaison entre ces deux souches est donc possible dans le milieu pauvre, mais la fréquence de transfert n'est pas très élevée. Nous avons ensuite déterminé quelles étaient les concentrations minimales d'antibiotiques sélecteurs qui permettaient l'élimination du PAO 16.70 (56) tout en conservant la vitalité du nouveau conjugué PAO 8 56. La concentration en carbénicilline allait de 500 à 16000 mcg/ml et celle de streptomycine de 1000 à 4000 mcg/ml. Différents temps de contact ont été également essayés.

Les résultats obtenus mettent en évidence que pour des concentrations de 2000 mcg/ml de carbenicilline et de 1500 mcg/ml de streptomycine, une inhibition totale du donneur et le maintien de la vitalité du receveur étaient observés.

Rappelons que le receveur est résistant chromosomiquement à la streptomycine et par l'intermédiaire d'un plasmide est résistant à la carbénicilline. Il est bien évident que les

conjugués ne poussent pas sur le milieu minimum glucose ou sur le milieu minimum glucose additionné d'adénine et de leucine alors que leur croissance est normale sur le milieu minimum additionné de méthionine, d'isoleucine et de valine.

L'expérimentation proprement dite consiste à effectuer des prélèvements de trois gouttes de milieu de culture dans les tubes A et B aux temps zéro, 60, 120 et 200 minutes. Ces prélèvements et leurs dilutions au 1/100, 1/1000 et 1/10000 sont ensuite étalés respectivement sur des milieux solides Muller Hinton et Muller Hinton additionné de carbénicilline et de streptomycine ; le comptage des colonies devant permettre d'affirmer l'hypothèse de travail.

L I V R E I V

RESULTATS

I - Méthode de marquage du matériel génétique selon la méthode à l'adénine tritiée

Les souches utilisées dans cette manipulation sont les souches sauvages (HL), les souches PAO12 (56) et les souches PAO12 (RP₁).

La démarche expérimentale est identique pour toutes les souches.

Le marquage est réalisé à la troisième génération et la quantité de radioactivité dans les 10 ml de culture correspond à 74 μ ci. Après centrifugation à 12300 t/mn, la lyse est obtenue par une solution de lysozyme à 2 mg/ml final, de RNA ase à 500 mcg/ml et de N lauryl sarcosine à 4 % (P/V).

Le chauffage préalable de la RNAase à 80° C pendant 10 minutes est nécessaire pour éliminer les traces de DNAase. Lors de l'homogénéisation à la seringue à I.D.R., la consistance visqueuse du mélange est le signe de la présence d'ADN. La préparation du gradient d'ultracentrifugation nécessite un ajustement rigoureux de l'indice de réfraction. La densité finale doit avoisiner 1700 g.cm³, soit un indice variant de 1,390 à 1,395.

Nous avons fait varier de quelques heures, l'ultracentrifugation sans déceler de modifications sensibles. La moyenne se trouvant vers 65 heures. Le recueil du gradient par perforation

inférieure du tube pose un certain nombre de problèmes techniques seulement résolus par un grand nombre d'essais. Il convient à ce sujet de procéder avec soin, car une turbulence intempestive perturbe à coup sûr le gradient. Il est d'autre part nécessaire de procéder au recueil le plus tôt possible après l'arrêt de l'ultracentrifugeuse, sinon il y a risque de voir le gradient se casser.

Le gradient est recueilli par fraction de 5 gouttes.

20 µl de ces fractions sont traitées par 0,5 ml de NaOH à 2 M et incubées 24 heures. La solution est ensuite neutralisée par 0,5 ml d'HCl, puis traitée successivement par 0,5 ml d'acide trichloracétique, à 25 %, 2 ml à 10 % et 4 ml d'acide acétique à 1 %. Le filtre Millipore utilisé présente des mailles de 0,22 µ et un dépôt rouge dû au bromure d'éthidium est observé dont l'intensité va en croissant, fraction après fraction.

Les filtres séchés à l'étuve sont ensuite immergés dans un mélange scintillant, qui permet le comptage de la radioactivité.

Nous avons effectué :

1) 3 essais sur la souche HL

Le nombre moyen de fractions recueillies a été de 50. Il a été difficile de tirer des conclusions de ces courbes. Aucun pic significatif n'a pu être relevé avant le pic important d'ADN chromosomique.

Il faut noter que, malgré des techniques apparemment identiques, le comptage a révélé des différences significatives dans le marquage de l'ADN (entre 24 000 cpm et 6000 cpm correspondant à une fraction 20 µl). Il s'agit sans doute d'un métabolisme différent de l'adénine marquée qui peut être dû à un certain nombre de facteurs que nous n'avons pas eu le temps de préciser.

2) 11 essais sur PAO 12 RP₁ (plasmide de référence)

Nous avons effectué de nombreux essais sur cette souche connue comme étant porteuse d'un plasmide. En effet, nous désirions contrôler l'efficacité de notre méthode d'isolement de plasmide.

Le nombre moyen de fractions recueillies a été de 50, même si ces fractions ont été quelquefois groupées par deux pour faciliter la manipulation.

Le pic d'ADN chromosomique apparaît toujours avec une valeur moyenne de 6 à 7000 cpm. Il existe sur les tracés juste avant ce pic, une zone plus élevée que la ligne de base sous forme d'un seul pic ou d'une succession de pics ayant une valeur moyenne de 300 cpm. Il s'agit sans aucun doute du plasmide RP₁ présent dans la souche. (Voir courbe de marquage page 122).

Mais il faut noter que la mise en évidence de ce plasmide n'est pas systématiquement obtenue, d'où la nécessité de répéter de nombreuses fois les essais.

METHODE PAR MARQUAGE DU MATERIEL GENETIQUE A L'ADENINE TRITIEE.

Souche utilisée : PAO 12 RPI

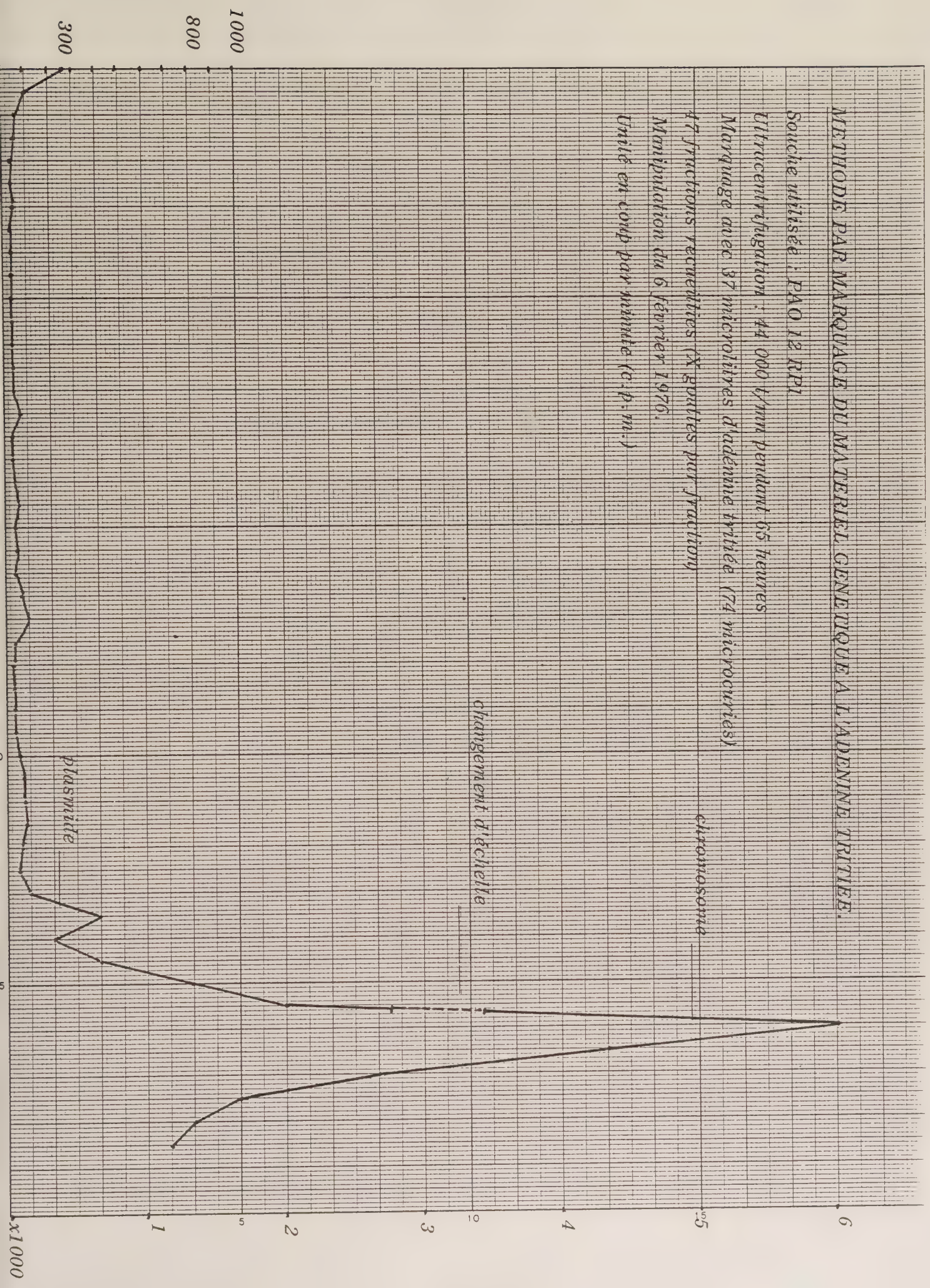
Ultracentrifugation : 44 000 t/min pendant 65 heures

Marquage avec 37 microlires d'adénine tritiée (774 microcuries)

47 fractions recueillies (X gouttes par fraction)

Manipulation du 6 février 1976.

Unité en comp par minute (c.p.m.)



3) 3 essais sur PAO12 (56)

Ces essais semblent démontrer la présence du plasmide 56 Be. 60 fractions ont été recueillies à chaque manipulation. Les pics plasmidiques correspondent en moyenne à 300-400 cpm et les pics chromosomiques 10-11000 cpm.

La position des 2 pics est d'autre part, reproductible à chaque expérience.

Nous pouvons conclure à la présence "physique" du plasmide 56 Be (voir courbe page 124).

II - Essai de marquage spécifique du plasmide selon une méthode originale

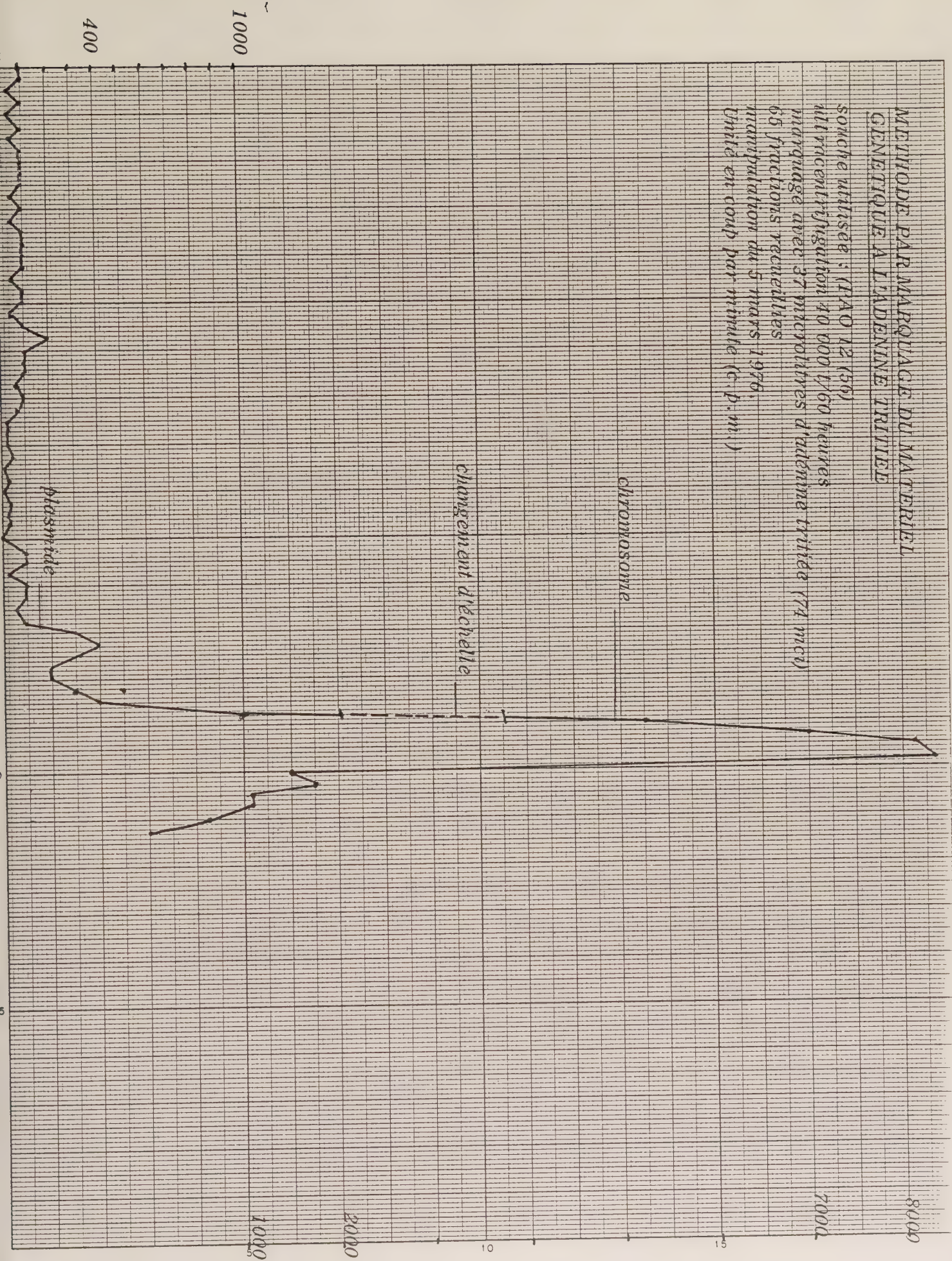
Cette méthode devrait permettre théoriquement l'isolement du plasmide 56 Be grâce à son marquage exclusif dans la bactérie receveuse.

Lors des essais pratiqués avec l'appareillage élaboré par nos soins, nous avons tenté d'affirmer l'hypothèse de travail par le comptage des colonies. Nous avons effectué des prélèvements dans les cylindres A et B au temps zéro, 60, 120 et 200 minutes. Ces prélèvements dilués au 1/100, 1/1000 et 1/10000 ont été ensuite étalés sur des milieux solides M-H et M.H. additionné de carbenicilline et streptomycine.

Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de nombres significatifs de comptage (sur le milieu carbénicilline-streptomycine)

METHODE PAR MARQUAGE DU MATERIEL GENETIQUE A L'ADENINE TRITIEE

source utilisée : (HAO 12 (56))
all centrifugation 40 000 l/60 heures
marquage avec 37 microlitres d'adénine tritiée (74 mci)
65 fractions recueillies
manipulation du 5 mars 1976,
Unité en coup par minute (c.p.m.)



des colonies issues des prélèvements dans le cylindre B.

Il semble que les difficultés rencontrées proviennent :

- 1) de la diffusion sélective de la bactérie porteuse du plasmide marqué ; cette mauvaise diffusion peut provenir d'un appareillage mal adapté (longueur du capillaire, composition du milieu minimum et nutritif) ou d'une altération du chimiotactisme sous l'action des antibiotiques, malgré la résistance de la souche à ces derniers.*
- 2) de la nécessité d'avoir un marquage d'activité spécifique très intense pour que, au cours de la réplication, il n'y ait pas dilution de la radioactivité dans les cellules-filles.*

III - Méthode de HUMPHREYS et coll.

L'avantage de cette méthode sur la précédente est l'absence d'utilisation de molécules marquées radioactivement, la radioactivité représentant une difficulté certaine dans la manipulation (précautions, matériel contaminé...).

Par contre, la technique d'HUMPHREYS nécessite de travailler sur de grosses quantités de culture. L'arrêt de l'incubation de la souche PAO8 (56) a été déterminé après plusieurs essais ; il semble que la fin de la phase exponentielle de croissance représente le moment optimum. (7 heures).

Avant d'entamer le processus de lyse des protoplastes, il est impératif d'obtenir une suspension homogène des bactéries dans le tampon Tris base ; les agrégats de cellules sont en effet

difficilement soumis à une lyse correcte par l'E. D. T. A.

Différents essais ont montré qu'une lyse optimale était obtenue avec 3,5 ml de solution saturée d'E. D. T. A. pendant 4 à 6 heures. L'adjonction à l'E. D. T. A. de RNAase, lizozyme, pronase n'entraînent pas, à notre sens, d'amélioration sensible de l'opération.

Après cette lyse de 4 à 6 heures réalisée à 4°C, et sous agitation lente, on peut observer dans le milieu un éclaircissement caractéristique.

Le P. E. G. 6000, donnant la précipitation de L'ADN, se présente sous forme de gros cristaux et il nous semble préférable de pulvériser le polyéthylène glycol préalablement dans un mortier. La précipitation paraît être réalisée après 10 à 12 heures.

La centrifugation, qui permet d'éliminer le surnageant, ne doit pas être trop rapide afin de ne pas obtenir un culot trop compact difficilement redissous dans 8 ml de tampon S. S. C. . La redissolution dans 8 ml d'un mélange Tris à 0,05 M, EDTA à 0,005 M et NaCl à 0,05 M n'apporte aucune amélioration.

Nous avons évité une étape de déprotéinisation au chloroforme-octanol du fait de la formation d'une solution micellaire impossible à séparer. Après l'ajustement du gradient de chlorure de césium et l'adjonction de bromure d'éthidium, les tubes sont remplis complètement grâce à de la parafine stérile

et équilibrés au décigramme. L'huile de parafine évite l'écrasement du tube pendant l'ultracentrifugation.

Pour éviter la formation d'une calotte compacte de débris cellulaires qui gêne la récupération de l'ADN, nous procédons à une ultracentrifugation préalable de deux heures à 36 000t/mn suivie de l'élimination des débris cellulaires déjà rassemblés.

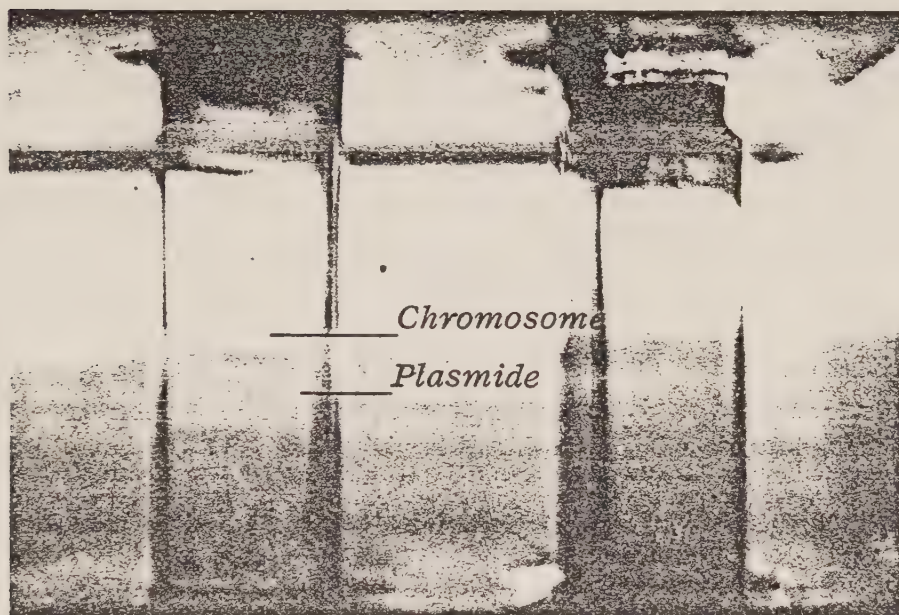
A l'issue de l'ultracentrifugation de 65 heures, l'ADN doit être repérable en lumière ultraviolette à 260 nm. Sur les nombreux essais pratiqués, nous avons observé 5 fois les deux disques caractéristiques : le disque supérieur relativement important du chromosome et le disque inférieur plus fin du plasmide (distance entre les disques : 3 mm). Après récupération du disque d'ADN plasmidique, nous procédons à une seconde ultracentrifugation afin de purifier cet ADN. (voir photographie page 128).

La récupération du matériel plasmidique est réalisée dans de bonnes conditions par prélèvement par le haut du tube. Les essais de prélèvements latéraux, pourtant préconisés par certains auteurs (ROUSSEL), nous ont posé des problèmes techniques importants.

L'extraction du bromure d'éthidium et l'élimination du chlorure de césium par dialyse ne posent aucun problème particulier, en dehors de la nécessité de préserver l'ADN de la lumière.

DEUXIEME ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE
CHLORURE DE CESIUM

*Il reste un petit disque d'ADN chromosomique situé au-dessus
du disque d'ADN plasmidique.*



(Photothèque laboratoire Bactériologie C.H.U Besançon)
(Pr MICHEL-BRIAND)

L'observation au microscope électronique (voir photographie page 130) nous a posé de réels problèmes : du fait des liaisons probables du plasmide, soit avec le chromosome, soit avec la membrane, nous avons observé de nombreuses formes non "étaillées" ; la concentration en ADN plasmidique étant peu importante, nous n'avons pas toujours pu consacrer tout le temps qui aurait été nécessaire pour une exploration systématique de nos fractions.

Signalons que de nombreuses figures observées au microscope électronique, en particulier des brins très longs, provenaient de contaminations chromosomiques.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.



Plasmide de la souche PAO 8(56).

Photographie réalisée au Laboratoire de Microbiologie, Biocentre de l'Université de Bâle. (Dr MEYER)

C O N C L U S I O N S

L'étude systématique de la résistance de Pseudomonas aeruginosa à la carbénicilline (75), et les essais de transfert de cette résistance à des souches de référence PAO dépourvues de plasmide ont permis de mettre en évidence un transfert de la résistance à la seule carbénicilline à partir d'une souche 56 Be (57).

Des travaux ultérieurs ont montré que ce plasmide était très voisin du plasmide RP1-1 décrit par INGRAM (48). Ce type de plasmide n'a jamais encore été isolé jusqu'à présent, tant par les méthodes d'ultracentrifugation classiques que par électrophorèse (JACOBY, communication personnelle).

Nous avons cependant tenté d'extraire puis d'isoler ce plasmide R 56 Be, en particulier par une méthode dite au PEG 6000 utilisant un grand volume de culture, et qui permet donc d'augmenter les chances d'individualiser ce facteur extra-chromosomique.

Les difficultés que nous avons rencontrées lors de nos essais tiennent à plusieurs raisons :

1) ce plasmide est un organite de taille réduite par rapport au chromosome qui peut le masquer lors de l'isolement.

2) Les méthodes employées sont longues et la succession des opérations importante. La manipulation est délicate dans son ensemble : ainsi, il est nécessaire, par une stérilité rigoureuse, d'éviter l'action possible des endonucléases exogènes des bactéries contaminantes de l'air.

Signalons que ces deux premières remarques s'appliquent à l'isolement de n'importe quel plasmide.

3) La troisième raison tient à la nature même du plasmide 56 Be, et nous ne pouvons formuler que des hypothèses :

- Quelles sont les véritables relations du plasmide et du chromosome ?

- Quelle est la nature des liaisons plasmide-membrane ?

L'importance de ces liaisons est déterminante : la sédimentation du chromosome ou de la fraction membranaire peut conduire, au cas où ces liaisons sont importantes avec ces organites à une élimination du facteur R au cours des étapes de "purification". Mais ces difficultés reflètent justement l'originalité de ce plasmide.

Une réponse à ces questions devrait permettre d'expliquer le rendement faible et variable des isollements.

- A l'issue de ce travail, et malgré ses imperfections, nous pouvons néanmoins affirmer l'existence 'physique' du plasmide 56 Be, existence seulement préssentie génétiquement lors des conjugaisons bactériennes.

TABLE DES ABREVIATIONS

Ampi = Ampicilline

CCC DNA = covalently closed circular desoxyribonucleic acid

CAM = camphre

E.D.T.A. = acide éthylenediaminotétraacétique, sel disodique

EtBr = bromure d'éthidium

IS = séquence d'insertion

MM = milieu minimum

MMC = chlorure méthyl mercurique

OCT = octane

PMA = acétate phényl mercurique

SDS = dodécyl sulfate de sodium

Sm = streptomycine

Tetra = tetracycline

Tn = transposon

B I B L I O G R A P H I E

1 - ACHTMAN M., HELMUTH R.,

A redefinition of bacterial conjugaison

Société Française de Microbiologie, Paris Institut Pasteur, 1976.

2 - ADLER H.I., FISCHER W.D., COHEN A., HARDIGREE A.A.

Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1967, 57, 321-326.

3 - ANDERSON E.S., LEWIS M.J.

Characterisation of a transfer factor associated with drug resistance in Salmonella typhimurium.

Nature 1965, 208, 843-849.

4 - ANDERSON

A rapid screening test for transfer factor in drug sensitive Enterobacteriaceae.

Nature 1965, 208, 1016.

5 - ARBER W., LINN S.

DNA modification and restriction.

Annual Review of Biochemistry 1969, 38, 467-500.

6 - AVRIL J.L., GERBAUD G.R.

Indépendance des plasmides hébergés par les Escherichia coli de malades hospitalisés sans antibiothérapie.

Ann. Microbiol. (Institut Pasteur) 1976, 127 B, 167-175.

- 7 - BAYLI R.C., Mc KENZIE D.I.

Catechol oxygenases of pseudomonas putida mutant strains.
J. of Bact. 1976, 127, n° 3, 1098-1107.

- 8 - BOUANCHAUD D.H., CHABBERT Y.A.

"Stable coexistence of three resistance factors (fi⁻) in Salmonella panama and Escherichia coli K 12".
J. gen. Microbiol. 1969, 58, 107-113.

- 9 - BOUANCHAUD D.H.

Aspects de l'hérédité non chromosomique chez les bactéries, structure, réplication et classification des plasmides de résistance aux antibiotiques.
Bulletin de l'Institut Pasteur 1973, 71, 49-73.

- 10 - BOYER H.

Genetic control of restriction and modification in Escherichia coli.
J. of Bact. 1964, 88, 1652-1660.

- 11 - BRINTON C.C.

The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 1965, 27, 1003-1054.

- 12 - BRYAN L., SHAHRABADI M.S., VAN DEN ECZEN H.M.

Gentamicin resistance in Pseudomonas aeruginosa R Factor mediated resistance.
Antimicrobial agents and Chemotherapy 1974, 6, n° 2, 191-199.

- 13 - CAMPBELL A.M.

Episomes.
Coll. Modern. Perspectives in Biology N.Y. 1969.

- 14 - CHABBERT Y.A., SCAVIZZI M.R., WITCHITZ J.L., BERBAUD G.R., BOUANCHAUD D.H.

Incompatibility groups and the classification of fi⁻ resistance factors.
J. of Bact. 1972, 112, n° 2, 666-675.

15 - CHABBERT Y.A.

Données actuelles sur la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Actual. pharmacol. 1973, 26, 28-68.

16 - CHAKRABARTY A.M.

Plasmids in Pseudomonas.

Ann. Rev. Genet. 1976, 10, 7-30.

17 - CHAKRABARTY A.M.

Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas.

J. of Bact. 1973, 112, 815-823.

- 18 - CHAKRABARTY A.M., CHOU G., GUNSALUS I.C.

Genetic regulation of octane dissimulation plasmid in Pseudomonas.

Procl. Nath. Acad. Sci., USA 1973, 70, 1137-1140.

19 - COHEN N., MILLER A.

Multiple molecular species of circular R-factor DNA isolated from Escherichia coli.

Nature 1969, 224, 1273-1276.

20 - COHEN S.N., SILVER R.P., Mc COUHEY, SCHARP P.A.

Isolation of catenated forms of R factor DNA from minicells.

Nature, 231, 249-252.

- 21 - COHEN S.N., SCHARP P.A., DAVIDSON N.

Investigation on the molecular structure of R-factors.

In "Bacterial plasmids and antibiotic resistance" 1972, 269-282.

22 - COHEN N.S.

Transposable genetic elements and plasmid evolution.

Nature 1976, 263, 731.

- 23 - CRESS E., KLINE C.

Isolation and characterization of Escherichia coli chromosomal mutants affecting plasmid copy number.

J. of Bact. 1976, 125, n° 2, 635-642.

24 - CUZIN F., JACOB F.

Analyse génétique fonctionnelle de l'épisome sexuel.

C.R. Ac. Sciences 1965, 260, 2087.

25 - CUZIN F., JACOB F.

Mutations de l'épisome F d'Escherichia coli K 12 mutants à réplication thermosensible.

Ann. Int. Pasteur 1967, 112, 4, 398-418.

26 - CUZIN F., JACOB F.

Délétions chromosomiques et interprétations de l'épisome F lac⁺.

C.R. Ac. Sciences 1964, 258, 1350-1352.

27 - DAVEY J.F., GIBSON D. T.

Bacterial metabolism of para - and meta - xylène oxidation of a methyl substituent.

J. of Bact. 1974, 819, 923-929.

28 - DAVIS R.S., MOSSLER F.E., STONE R.W.

Metabolism of p and m. xylene by species of Pseudomonas.

Can. J. Microbiol. 1968, 14, 1005-1009.

29 - DATTA N., HEDGES R.W., SHAW E.J., SYKES R.B.
RICHMOND M.H.

Properties of an R-factor from Pseudomonas aeruginosa.

J. of Bact. 1971, 108, 1244-1249.

30 - DATTA N., HEDGES R.W.

Compatibility groups among f_i^- R factors.

Nature 1971, 234, 222-223.

31 - DELHALLE E., GRATIA J.P.

Transduction de facteurs de résistance aux antibiotiques et de propriétés colicinogènes par le bactériophage.

Ann. Microbiol. (Inst. Past.) 1976, 127 B, n° 4, 447-451.

32 - DHAR M.M., KHAN A.W.

Fromation of antibiotics.
Nature 1971, 233

33 - DUNN N.W., GUNSALUS I.C.

Transmissible plasmid coding early enzymes of naphtalene oxidation in Pseudomonas putida.
J. of Bact. 1973, 114, 974-979.

34 - ELWELL L.P., DE GRAAF J., SEIBERT D., FALKOW S.

Plasmid-linked ampicillin resistance in haemophilus influenzae type b.
Infection and Immunity 1975, 12, n° 2, 404-410.

35 - ERSKIN B., LINN S.

The desoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of Escherichia coli B.
J. Biol. Chem. 1972, 247, 6183.

36 - EVANS J., GALINDOE, OLARTE J., FALKOW S.

B-lactamase of R factors.
J. of Bact. 1968, 96, 1441.

37 - FENNEWALD M., BENSON S., SCHAPIROT J., BOCH G.

Mutations affecting plasmid-determined phenotypes.
2sd ASM meeting "Extrachromosomal Elements"
Jackson 1977.

38 - FREDERICQ P.

The recombination of colicinogenic factors with other episomes and plasmids in "Bacteiral episomes and plasmids".
J. and A. Churchill, Edit., Londres 1969, 163.

39 - FREDERICQ P., DELHALLE E.

Ann. Inst. Pasteur 1972, 22, 909-921.

- 40 - FREIFELDER D., FREIFELDER D.
Studies on Escherichia coli sex factors.
J. Mol. Biol. 1968, 32, 15-23.
- 41 - FRIELLO D.A., MYLROIE J.R., GIBSON D.T., ROGERS J.E.,
 CHAKRABARTY A.M.
XYL, a non conjugative xylene-degradative plasmid in Pseudo-
monas PXY.
J. of Bact. 1976, 127, n° 3, 1217-1224.
- 42 - GIBSON D.T., HENSLY M., YOSHIOKA H., MABRY T.J.
Formation of (+)-cis, 2,3, dihydroxy-1-methyl-cyclohexa-4,6-
diene from toluene by Pseudomonas putida.
Biochemistry 1970, 9, 1626-1630.
- 43 - GORDON C.N., KLEINSCHMIDT A.K.
High contrast staining of individual nucleic acid molecules.
Biochimica and Biophysica Acta 1968, 155, 305-307.
- 44 - GRINDLEY N., HUMPHREYS G., ANDERSON E.
Molecular studies of R-Factors compatibility groups.
J. of Bact. 1973, 115, 387-398.
- 45 - GRINSTED, SAUNDERS J.R., INGRAM L.C., SYKES R.B.,
 RICHMOND M.H.
Propertie of an R-factor which originated in Pseudomonas
aeruginosa 1822.
J. of Bact. 1972, 110, 529-537.
- 46 - HAYES W.
The genetics of bacteria and their viruses.
2e ed. New York 1970.
- 47 - HUMPHREYS G., ANDERSON E.
Nouvelle méthode sur R.A.
Bioch. Bioph. Acta 1975, 383, 457-463.

- 48 - INGRAM L., SYKES R. B., GRINSTED J., SAUNDERS J. R.,
RICHMOND M. H.

A transmissible resistance element from a strain of Pseudomonas aeruginosa containing no detectable extrachromosomal DNA.
J. Gen. Microbiol. 1972, 72, 269-279.

- 49 - INSELBURG J.

R-factors DNA in chromosomeless progeny of Escherichia coli.
J. of Bact. 1971, 105, 620-628.

- 50 - INSTITUT PASTEUR

Bactéries, bactériophages.
Ediscience 1974, Mc Graw-Hill, Paris.

- 51 - JACOB F., WOLMANN E.

Sexuality and the genetics of bacteria.
Academic Press 1961.

- 52 - JACOB F., BRENNER S.

*Sur la régulation de la synthèse du DNA chez les bactéries :
l'hypothèse du réplicon.*
C.R. Acad. Sci. (Paris) 1963, 256, 298-300.

- 53 - JACOB F., BRENNER S., CUZIN F.

On the regulation of DNA replication in bacteria.
Cold Spring harbor Symposium on quantitative biology 1963,
28, 329-348.

- 54 - JACOB E., GRINTER N. J.

Plasmid RP₄ as a vector replicon in genetic engineering.
Nature, London 1975, 255, 504-505.

- 55 - JACOBY G. A.

Properties of R plasmids in Pseudomonas aeruginosa.
Microbiology 1974, edited D. Schlessinger ASM 1975 Washington.

- 56 - JACOBY G. A.

*2e Réunion sur les plasmides de l'Association américaine de
Microbiologie.*
Février 1977, Jackson (Wyoming).

57 - JOUVENOT M.

Mécanismes génétiques moléculaires de la résistance à la carbénicilline chez les souches de Pseudomonas aeruginosa isolées au C.H.U. de Besançon.

Mise en évidence d'un nouveau facteur de résistance : le facteur RP 56.

Thèse Sciences Lyon 1975, n° 453.

58 - JOUVENOT M.

Carbenicillin resistance and β -lactamase activity in Pseudomonas aeruginosa.

10e Th international congress of Chemotherapy Zürich 1977.

59 - JUSTIN Mc CORMICK F., MAHER M.

Problems in the extraction of DNA when utilizing pancreatic RNAase and pronase.

Biochimica and Biophysica Acta 1974, 349, 145-147.

60 - KLEINSCHMIDT

Monolayer Techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules.

Methods in Enzymology 1968, 12 B, 361-377.

61 - KLINE, MILLER.

Detect. of cointegrated plasmid desoxyribonucleic in chromosome of Escherichia coli.

J. of Bact. 1975, 121, 165-172.

62 - LACEY R. W.

Transfer of tetracycline-resistance between strains of Staphylococcus aureus in mixed cultures.

J. of Gen. Microbiol. 1971, 69, 229-237.

63 - LANG D., MITANI M.

Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers.

Methods in Enzymology 1970, 9, 373-379.

- 64 - LAUB-KUPERSZTEJN R., ANTOINE O., POHL P., THOMAS J.
Caracterisation par zymogrammes des β -lactamases déterminées par des facteurs R sauvages ou de référence.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1976, 127 A, 237-246.
- 65 - LEDERBERG
Cell genetics and symbiosis hereditary.
Physiologie Rev. 1952, 32, 403-430.
- 66 - LE MINOR L., COYNAULT C., CHABBERT Y.A., GERBAUD G.,
LE MINOR S.
Groupes de compatibilité de plasmides métaboliques.
Ann. Microbiol. (Institut. Pasteur) 1976, 127 B, 31-40.
- 67 - LEVY B.
R factor proteins synthesized in Escherichia coli minicells : incorporation studies with different R factors and detection of desoxyribonucleic acid-binding proteins.
J. of Bact. 1974, 120, n° 3, 1451-1463.
- 68 - LOWBURY E.J.C., KIDSOW A., LILLY A.H., AYLIFFE G.A.J.
Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics : emergence of strains highly resistant to carbenicillin.
The Lancet 1969, 448-452.
- 69 - MEYNELL G.G., LAWN A.M.
Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factor Ib by Salmonella typhimurium.
Genet. Res. 1967, 9, 359-367.
- 70 - MEYNELL E., MEYNELL G.G., DATTA N.
Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids.
Bact. Rev. 1968, 32, 55-83.
- 71 - MEYNELL E., COOKE M.
Repressor minus operator constitutive de-repressed mutants of F-like R-factors ; their effect on chromosomal transfer by HfrC.
Genet. Res. 1969, 14, 1309-1313.

72 - MEYNELL G.G.

Bacterial plasmids.
The Macmillan press LTD 1972.

73 - MICHEL-BRIAND T., BRUAND L.

Etude de la production de β -lactamase pour la carbénicilline chez trente souches de Pseudomonas aeruginosa.
C.R. Acad. Sci. 1972, 275, 503-506.

74 - MICHEL-BRIAND Y.

Résistance extrachromosomique aux antibiotiques et flore bactérienne intestinale. I. Fréquence et rôle de l'ingestion de bactéries exogènes.
Accepté pour publication dans la Nouvelle Presse Médicale.

75 - MICHEL-BRIAND Y., JOUVENOT M., PERRET T.

Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques : augmentation de la résistance de Pseudomonas aeruginosa à la carbénicilline au cours des années 1972-1973.
99e Congrès National des Sociétés savantes 1974, Besançon.

76 - MICHEL-BRIAND Y., JOUVENOT M.

Identification of five carbenicillin R-factor in Pseudomonas aeruginosa.
9 th F.E.B.S. meeting Budapest 1974, Abs f 173.

77 - MICHEL-BRIAND Y., JOUVENOT M.

Mise en évidence d'un facteur de résistance à la carbénicilline chez Pseudomonas aeruginosa.
C.R. Acad. Sci (Paris) 1975, 280, 2397-2400.

78 - MICHEL-BRIAND Y.

Facteur de résistance transmissible mis en évidence chez Pseudomonas aeruginosa : arguments en faveur de sa nature plasmidique.
Compte-rendu des séances de la Société de Biologie 1976, 170, 5, 1026.

79 - MICHEL-BRIAND Y., VILMA A., STANISICH, JOUVENOT M.

Pseudomonas aeruginosa strain isolated in France that carries a plasmid determining carbenicillin-resistance.
Antimicrobial agent and Chemotherapy 1977, II, n° 4, 589-593.

80 - MICHEL-BRIAND Y.

Résistance extrachromosomique aux antibiotiques et flore bactérienne intestinale. I.

Accepté pour publication dans La Nouvelle Presse médicale.

81 - MITSUHASHI S., HAADA K., KAMEDA M., SUZUKI W., EGAWA R.

On the drug resistance enteric bacteria. III. Transmission of the drug resistance from Shigella to F⁻ or Hfr strains of Escherichia coli K 12.

Jap. J. exp. Med. 1960, 30, 301-306.

82 - MIZON F.M., GERBAUD G.R., CHABBERT Y.A.

Instabilité des plasmides de type F₁₁ chez Salmonella panama.

Ann. Microbiol. 1976, 127 B, 25-30.

83 - MOMURA J.

Colicins and related bacteriocins.

Ann. Rev. Microbiol., 1967, 21, 257.

84 - MOODY E.E.M., HAYES W.

Chromosome transfer by autonomous transmissible plasmids ; the role of the bacterial recombination (rec) system.

J. of Bact. 1972, 111, (1), 80-85.

85 - NISIOKA T., MITANI M., CLOWES R.

Composite circular forms of R-factor DNA molecules.

J. of Bact. 1969, 97, 376-385.

86 - NOVICK R.P.

Penicillinase plasmids of staphylococcus aureus.

Fed. Proc. 1967, 26, 29-38.

87 - NOVICK R.P.

Extrachromosomal Rev. 1969, 32, 210-235.

88 - NOVICK R.P., SMITH K., SHEELY R.J., MURPHY E.

A catenated intermediate in plasmid replication.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973, 54, 1460-1469.

- 89 - NOVICK R.P., ROYSTON C., CLOWES S., COHEN ., CURTIS III, Datta N., FALKOW S.

Uniform nomenclature of bacterial plasmids : a proposal.
J. of Bact. 1976, 40, 1, 168-189.

- 90 - OCHIAI K., YAMANAKA T., KIMURA K., SAWADA O.

Studies on inheritance of drug resistance between Schigella strains and E. coli strains.
Nippon Iji Schimpo 1959, 1861, 34.

- 91 - PALCHAUDHURIS S., CHAKRABARTY A.

Isolation of plasmid desoxyribonucleic acid from Pseudomonas putida.
J. of Bact. 1976, 126, n° 1, 410-416.

- 92 - PEMBERTON H., CLARK S.

Detection et caractérisation des plasmides chez une souche de Pseudomonas aeruginosa PAO.
J. of Bact. 1973, 114, 424-433.

- 93 - PIERUCCI O., ZUCHOWSKI C.

Non-random segregation of DNA strands in Escherichia coli B/r.
J. Mol. Biol. 1973, 80, 477-503.

- 94 - PITTON J.S.

Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics.
Rev. Physiol. Biochem.exp. pharmacol. 1972, 65, 15-93.

- 95 - RADLOFF R., BAUER W., VINOGRAD J.A.

A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA.
Proc. Natl. Academy of Sciences 1967, 57, 1514-1521.

- 96 - REANNEY D.

Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development.
Bact. Rev. 1976, 40, 3, 552-559.

97 - RICHMOND D., SYKES R.

The β -lactamase of gram negative bacteria and their possible physiological role.

Advances in Microbiol. Physiology 1973, 9, Edit. A.H. Rose et W. Tempest.

98 - SCAVIZZI M.R.

Existence de deux caractères transférables de résistance aux tétracyclines.

Ann. Inst. Pasteur 1972, 122, 3-17.

99 - SILBERSTEIN S., INOUE M.

The effect of lysozyme on DNA membrane association in Escherichia coli.

Biochemica et Biophysica Acta 1974, 366, 149-158.

100 - SMITH D.H.

R factors mediated resistance to mercury, nickel and cobalt.
Science 1967, 156, 1114-1116.

101 - STANISCHICH V.A.

The properties and host range of Nale-specific bacteriophages.
J. Gene. Microbiol. 1974, 84, 332-342.

102 - STARLINGER P., SAEDLER H.

I.S. elements in microorganisms.

In current topic in microbiology and immunology.

Springer Verlag, Berlin 1976, p. 111-152.

103 - STUART B., LEVY

R factor proteins synthesized in Escherichia coli minicells : Incorporation studies with differend R factor and detection of desoxyribonucleic acid binding proteins.

J. of Bact. 1974, 120, n° 3, 1451-1463.

104 - SUMMERS A.O., SILVER S.

Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of Escherichia coli.

J. of Bact. 1973, 112, 1228-1236.

- 105 - SYKES R. B., GRINSTED J. *et coll.*

Some properties of R-factors isolated from Pseudomonas aeruginosa.

In "Bacteiral plasmid and antibiotic resistance". Internation. symposium infection antibiotic resistance Caste of Smolenica, Czechoslovakia 1971.

- 106 - SYKES R. B., MATTHEW M.

The B-lactamase of Gram negative bacteria and their role in resistance to β -lactamase antibiotics.

J. Antimic. Chemother. 1976, 2, 115-157.

- 107 - TAKANO T., WATANABE T., FUKASAWA T.

Mechanism of host-controlled restriction of bacteriophage lambda by R factors in Escherichia coli K 12.

Virology 1968, 34, 290-302.

- 108 - TOMOEDA M., INUZUKA M., KUBO N., NAKAMURA S.

Effective elimination of drug resistance and sex factors in Escherichia coli by sodium dodecylsulfate.

J. of Bact. 1968, 95, 1078-1089.

- 109 - TONOMURA K., MAEDA K., FUTAI F., NAKAGAMI T., YAMADA M.

Stimulative vaporisation of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria.

Nature (London) 1968, 217, 644-646.

- 110 - TONOMURA K., KANZAKI F.

The reductive decomposition of organic mercurials by cellfree ex tract of a mercury-resistant Pseudomonas.

Biochim. Biophys. Acta 1969, 184, 227-229.

- 111 - VIDON D.

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Bulletin de la Société de Pharmacie de Strasbourg 1975, XIII, n° 1.

112 - WATANABE T.

Evolutionary relationships of R factors with other episomes and plasmids.

Fed. Proc. 1960, 26, 23-28.

T A B L E D E S M A T I E R E S

LIVRE I

<i>Chapitre 1 - Introduction</i>	<i>I</i>
<i>Chapitre 2 - Définition</i>	<i>6</i>
<i>Plasmides et épisomes</i>	<i>7</i>
<i>Réplicon</i>	<i>8</i>
<i>Chapitre 3 - Classification des plasmides</i>	<i>13</i>
<i>Par incompatibilité</i>	<i>14</i>
<i>Par hybridation</i>	<i>16</i>
<i>Chapitre 4 - Propriétés des plasmides</i>	<i>17</i>
<i>Structure génétique d'un plasmide</i>	<i>18</i>
<i>Différents états des plasmides</i>	<i>21</i>
<i>Chapitre 5 - Transfert des plasmides</i>	<i>23</i>
<i>La conjugaison</i>	<i>24</i>
<i>La transduction</i>	<i>28</i>
<i>Chapitre 6 - Quelques exemples de plasmides</i>	<i>29</i>
<i>Plasmides porteurs uniquement des caractères de fertilité</i>	<i>30</i>
<i>Plasmides de résistance aux agents antibactériens</i>	<i>31</i>
<i>Chapitre 7 - Relation plasmide-chromosome</i>	<i>39</i>
<i>La recombinaison</i>	<i>40</i>
<i>Plasmides vecteurs de gènes</i>	<i>44</i>
<i>Chapitre 8 - Réplication des plasmides</i>	<i>46</i>
<i>Origine de la réplication</i>	<i>47</i>
<i>Evolution de la réplication</i>	<i>48</i>
<i>Contrôle de la réplication</i>	<i>50</i>
<i>Anomalies de réplication</i>	<i>51</i>
<i>Nombre de copies par cellule</i> .	<i>53</i>
<i>Chapitre 9 - Agents curants</i>	<i>55</i>
<i>Cure par intercalage entre les brins d'ADN</i>	<i>56</i>
<i>Cure par modification du site membranaire d'insertion</i>	<i>57</i>
<i>Cure par modification des protéines initiatrices</i>	<i>57</i>

<i>Chapitre 10 - Isolement des plasmides</i>	59
<i>Marquage radioactif de l'ADN</i>	60
<i>Extraction de l'ADN des autres constituants de la cellule .</i>	61
<i>Isolement du plasmide</i>	63
<i>Isolement des plasmides après essai d'enrichissement</i> <i>en ADN extrachromosomique</i>	64

LIVRE II

<i>Chapitre 1 - Plasmides et résistance aux antibiotiques</i>	68
<i>Chapitre 2 - Méthode de classification</i>	78
<i>Classification par l'étude de la compatibilité entre</i> <i>plasmides</i>	79
<i>Classification par l'étude de l'interaction entre phages</i> <i>et plasmides</i>	79
<i>Classification par hybridation</i>	80
<i>Chapitre 3 - Classification des plasmides</i>	81

LIVRE III

<i>Chapitre 1 - Matériel</i>	94
<i>Méthode par marquage du matériel génétique à l'adénine</i> <i>tritiée</i>	95
<i>Méthode de HUMPHREYS et coll.</i>	99
<i>Matériel de dialyse</i>	100
<i>Matériel pour l'essai de marquage spécifique du plasmide</i>	100
<i>Matériel pour la microscopie électronique</i>	102
<i>Chapitre 2 - Méthodes</i>	104
<i>Méthode par marquage du matériel génétique à l'adénine</i> <i>tritiée</i>	105
<i>Technique de HUMPHREYS et coll.</i>	108
<i>Essai de marquage spécifique du plasmide</i>	114

LIVRE IV

<i>Méthode de marquage du matériel génétique à l'adénine tritiée</i>	119
<i>Essai de marquage spécifique du plasmide selon une méthode originale</i>	123
<i>Méthode de HUMPHREYS et coll.</i>	125
 CONCLUSIONS	 131
 Table des abréviations	 134
 BIBLIOGRAPHIE	 135

C O N C L U S I O N S

I - Essai de marquage spécifique du plasmide

Cette méthode de séparation dans laquelle seul le plasmide est marqué n'a pas permis de tirer une véritable conclusion bien que sur le plan théorique cette séparation ait paru séduisante. Les difficultés rencontrées proviennent :

1) de la difficulté de la diffusion sélective de la bactérie porteuse du plasmide marqué ; cette mauvaise diffusion pouvant provenir d'un appareillage mal adapté (longueur du capillaire, composition du milieu minimum et nutritif) ou d'une altération du chimiotactisme sous l'action des antibiotiques, malgré la résistance de la souche à ces derniers.

2) de la nécessité d'avoir un marquage d'activité spécifique très intense pour que, au cours de la réplication, il n'y ait pas dilution de la radioactivité dans les cellules-filles.

II - Technique de HUMPHREYS et coll.

Nous avons fait varier de nombreux détails expérimentaux (quantités de Tris, de E.D.T.A., et de P.E.G. 6000, durée des temps de lyse, temps de centrifugation ...) pour adapter cette méthode primitivement préconisée pour Escherichia coli. Nous avons obtenu 5 fois la présence de 2 bandes (après ultracentrifugation à 36 000 tours/mn pendant 65 heures). Nous avons toujours récupéré la bande considérée comme plasmidique après une seconde ultracentrifugation et nous avons effectué un contrôle en microscopie électronique (méthode de KLEINSCHMIDT et de LANG et MITANI).

Nous avons pu confirmer 3 fois que cette deuxième bande correspondait à un plasmide (microscopie électronique - photographie).

III - Méthode par marquage du matériel génétique à l'adénine tritiée.

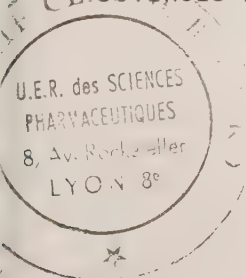
Nous avons utilisé la méthode dérivée des travaux de RADLOFF et coll.. Cette méthode consiste à incorporer de l'adénine tritiée dans la bactérie et à isoler le plasmide du chromosome par ultracentrifugation. Nous avons tenté de mettre en évidence le plasmide 56 Be.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

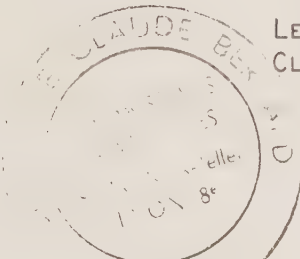
VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 12 octobre 1977

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R. DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES,



Handwritten signature



Handwritten signature

C O N C L U S I O N S

Préalablement, nous avons extrait et caractérisé le plasmide (RP₁) d'une souche PAO 12 (RP₁), cette manipulation servant de référence. Puis nous avons tenté 3 fois l'extraction et l'isolement du plasmide 56 Be ; les résultats confirment la présence de ce plasmide.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LELE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,